

Agradecimientos

La realización y el término de este Trabajo Final de Máster no podrían haber sido posibles sin la colaboración de diversas personas que durante el camino me acompañaron en el desarrollo de este proyecto, a ellos les expreso mi más sincera gratitud.

Agradezco al director del proyecto, Dr. Pere Garriga Solé por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto en su grupo de investigación.

A la Dra. Eva Ramón Portes, por su paciencia y dedicación en la supervisión de este trabajo experimental, por compartir conmigo parte de sus conocimientos y experiencia en el área de la investigación.

A todos mis compañeros del GBMI que durante este tiempo me brindaron su apoyo y ayuda para continuar día a día realizando los ensayos de este trabajo. Ha sido un placer trabajar a su lado.

También agradezco a mis compañeros del Máster de Ingeniería Biotecnológica quienes me brindaron palabras de aliento en los momentos difíciles y quienes celebraron conmigo los logros obtenidos durante este tiempo.

En especial agradezco y dedico este trabajo a mi familia: a mi mamá y a mi papá quienes junto con mis dos hermanos, a pesar de la distancia siempre supieron brindarme su apoyo incondicional, su comprensión y sus sabios consejos para poder culminar este proyecto que dio inicio hace dos años. Es por ustedes y gracias a ustedes que he logrado finalizar un capítulo más de mi preparación profesional.

A ti, Dirk, quien durante este tiempo has sido un gran apoyo para continuar cada día, mil gracias por tu cariño, por tu paciencia y por todos tus consejos cuando los he necesitado, tanto de manera personal como profesional, eres una parte importante de mi vida y te agradezco por motivarme siempre a seguir superándome y a ser mejor persona cada día.

RESUMEN

Recientemente se han logrado grandes avances en la determinación de la estructura y función de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's). Los GPCR's constituyen gran familia de proteína integrales de membrana y se encuentran implicados en una gran variedad de procesos fisiológicos como la respuesta a hormonas y neurotransmisores, así como también son centrales en los sistemas sensoriales mediando las respuestas en los sentidos de la vista, olfato y el gusto.

Entre ellos se encuentra la familia de los receptores muscarínicos de acetilcolina, compuesta por 5 subtipos de receptores (M_1 - M_5), los cuales modulan la mayor parte de las acciones del neurotransmisor acetilcolina en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico. Los receptores muscarínicos han jugado un papel muy relevante en la comprensión del funcionamiento de la neurotransmisión. En este trabajo nos centraremos únicamente en los receptores M_1 y M_3 debido a su potencial participación en el mecanismo molecular de la enfermedad de Alzheimer

Hasta ahora se ha visto que estos receptores se encuentran implicados en varias patologías del sistema nervioso central, ya que modulan la señalización de diferentes sistemas neurotransmisores. Estos sistemas se ven alterados como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, donde se ha visto que modulan la degradación de la APP (proteína precursora de amiloide) por la α -secretasa y de esta forma evitan la formación de las placas neuríticas conocidas como β -amiloides ($A\beta$) características de esta enfermedad. Además se ha sugerido que como resultado de su interacción con la proteína tau, pueden jugar un papel muy relevante en la pérdida de neuronas colinérgicas a través de un mecanismo que involucra la interacción intracelular y extracelular de la proteína tau con los receptores muscarínicos M_1/M_3 presentes en este tipo de neuronas.

El objetivo de este trabajo es comprender y analizar detalladamente las propiedades biológicas y bioquímicas de las diferentes isoformas de la proteína tau (ya sean fragmentos o la proteína completa soluble) así como las posibles interacciones que puedan tener con los receptores muscarínicos en relación a su implicación con el Alzheimer. Para ello, el principal logro ha sido optimizar las metodologías de expresión y purificación de la proteína tau. Ello ha permitido, por primera vez en nuestro grupo, la obtención de la proteína tau purificada, así como también la obtención de los receptores muscarínicos mediante su expresión en líneas celulares apropiadas.

ABSTRACT

In recent times we have seen immense progress and innovation in the structure determination of G protein-coupled receptors (GPCR's). The GPCR's are part of a great family of transmembrane proteins and there are known to mediate responses to hormones and neurotransmitters, as well as there are essentials in sensorial systems that mediate responses to senses of sight, smell, and taste.

Among them is the muscarinic acetylcholine receptors family, this family consist of five receptor subtypes (M_1 - M_5), they mediate most of the actions of the neurotransmitter Ach in the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system. The muscarinic receptors have played a key role in the understanding of neurotransmission function. In this work, we focus mainly in the receptors M_1 and M_3 upon their potential role in molecular mechanism of Alzheimer disease.

So far we have seen that these receptors have been implicated in several pathophysiology of mayor diseases of the CNS because there are involved in a numerous neurotransmitter systems. These systems are disrupted like in Alzheimer disease (AD), where it has been seen that these receptors mediate the cleavage of amyloid precursor protein (APP) by α -secretase that generates amyloid plaques, one of the two main aberrant structures present in these disease. In addition, it has been recently suggested that as a result of the interaction between these receptors and tau protein, they may play a key role in the loss of cholinergic neurons through a mechanism implicating extracellular and intracellular interaction between tau protein and the receptors M_1 / M_3 present in this type of neurons.

The purpose of this work is to understand and analyze in detail the biochemical and biological properties of the different isoforms of tau (truncated tau or full-length) as well as the possible interactions that may have with the muscarinic receptors in relation with their involvement in Alzheimer disease. In order to accomplish this purpose, the main achievement has been the optimization of the methodologies for expression and purification of the tau protein. For the first time in our group, this has allowed to obtain a fraction of purified tau protein as wells as the expression of muscarinic receptors in an adequate cell expression system.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Origen del proyecto.....	11
1.2. La familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's).	11
1.2.1. Implicación de los GPCR's en la patología del Alzheimer (AD).....	13
1.3. Receptores muscarínicos de acetilcolina	14
1.3.1. Generalidades: estructura y función.....	16
1.4. Proteínas asociadas a microtúbulos: proteína tau.....	18
1.4.1. Generalidades de la proteína tau: estructura y función.	18
1.5. Posibles interacciones entre la proteína tau y los receptores muscarínicos M₁- M₃ implicándolos en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer.	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Líneas celulares y vectores.....	24
3.2. Obtención y purificación de ADNc plasmídico: Proteína tau y receptores M₁-M₃.	25
3.2.1. Estimación concentración y pureza del ADNc obtenido mediante Maxiprep.	27
3.3. Transfección y expresión de los receptores muscarínicos M₁ y M₃ en diferentes líneas celulares.....	28
3.3.1. Mantenimiento celular y transfección.	30
3.3.2. Recolección y conservación de células transfectadas.....	32
3.4. Obtención de la proteína humana recombinante tau en <i>Escherichia coli</i>.	33
3.4.1. Secuenciación y diseño de <i>primers</i>	33
3.4.2. Mutagénesis dirigida por PCR.	34
3.4.3. Enzimas de restricción y métodos electroforéticos para separar fracciones de ADN.	37
3.4.4. Ligación vector pET-17b-gen tau.....	40
3.4.5. Transformación, inducción y expresión.	42

3.4.6.	Tratamiento del sedimento bacteriano.	45
3.5.	Purificación de la proteína tau.	46
3.5.1.	Cromatografía de intercambio iónico.	46
3.6.	Análisis de expresión de receptores muscarínicos y de la proteína tau mediante métodos electroforéticos.	49
3.6.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (<i>SDS-PAGE</i>)	50
3.6.2.	<i>Western blot</i>	52
3.7.	Determinación de la concentración de la proteína tau purificada: método de Lowry.	56
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	59
4.1.	Estimación de la pureza y concentración del ADNc mediante el protocolo de Maxiprep. ...	59
4.1.1.	Transformación de células competentes DH5- α para la obtención de ADNc.	59
4.2.	Transfección y expresión de los receptores muscarínicos M₁ y M₃ en diferentes líneas celulares.	60
4.2.1.	Detección de la expresión mediante electroforesis <i>SDS-PAGE</i> y <i>Western blot</i>	60
4.3.	Obtención y purificación del gen de la proteína tau y el plásmido pET-17b.	62
4.3.1.	Digestión enzimática del vector PRKT42 para la obtención del gen de la proteína tau. 63	
4.3.2.	Obtención de un vector de expresión de la proteína tau mediante ligación	68
4.4.	Expresión y purificación de la proteína humana recombinante tau en <i>Escherichia coli</i>.	70
4.4.1.	Transformación e inducción y expresión de la proteína tau.	70
4.4.2.	Estandarización del protocolo de expresión de la proteína recombinante humana tau en <i>E.coli</i> analizado mediante electroforesis <i>SDS-PAGE</i> y <i>Western blot</i>	72
4.4.3.	Purificación cromatográfica de la proteína tau.	73
4.4.4.	Determinación concentración proteína tau purificada mediante método de Lowry... 76	
5.	CONCLUSIONES	79
6.	BIBLIOGRAFÍA	81
6.1.	Referencias bibliográficas	81
7.	ANEXOS	85
i.	Vectores empleados.	85
ii.	Protocolo de células competentes: CaCl ₂	86
iii.	Protocolo para crear un stock de una línea celular deseada.	87

iv. Protocolo de stripping.	88
v. Equipos empleados	89
vi. Soluciones empleadas.....	92

ABREVIATURAS

2xYT	<i>2x Yeast extract and triptone media.</i>
ACh/ACo.	Acetilcolina.
AD	<i>"Alzheimer disease".</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
amp	Ampicilina.
amp ^R	Gen de resistencia al antibiótico ampicilina.
APP	<i>"amyloid precursor protein".</i>
APS	<i>"Ammonium persulfate".</i>
ARN	Ácido ribonucleico.
BrEt	Bromuro de Etidio.
BSA	<i>"Bovine Serum Albumine".</i>
CH ₃ COOH	Ácido acético glacial
CuSO ₄	Sulfato de cobre II.
COS-1	<i>"African green monkey kidney fibroblast cells".</i>
DM	<i>"n-Dodecyl-β-D-Maltoside".</i>
DMEM	<i>"Dulbecco's Modified Eagle Medium".</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DO	Densidad óptica.
DTT	Ditiotreitol.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EtOH	Etanol.
FBS	<i>"Fetal bovine serum".</i>
FPLC	<i>"Fast Protein Liquid Chromatography".</i>
GPCR's	<i>"G Protein Coupled Receptors".</i>
HEK293-T	<i>Del inglés: "Human embryonic kidney 293 cells".</i>
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.
Isop.	Isopropanol.
KN	Kanamicina.
LB	Medio de cultivo Luria Bertani.
LB Agar	LB + agar. Placa de cultivo bacteriano.
M ₁	Receptor muscarínico 1.
M ₃	Receptor muscarínico 3.
mAChR's	<i>"Muscarinic acetylcholine receptor subtypes".</i>
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico.
H ₂ O _m Q	Agua milliQ®. Agua ultrapura.
NaAc.	Acetato de sodio.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio.
NacKtar	<i>"Potassium sodium tartrate tetrahydrate"</i>
O/N	<i>"Overnight".</i>

PAGE	<i>"Polyacrylamide gel electrophoresis"</i> .
PBS	<i>"Phosphate buffered saline"</i>
PCR	<i>"Polymerase chain reaction"</i> .
PEI	<i>"Polyethylenimine"</i> .
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonato.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	<i>"Sodium dodecyl sulfate"</i> .
SNA	Sistema nervioso autonómico.
SNC	Sistema nervioso central.
SHSY5Y	<i>"Human Neuroblastoma cells"</i> .
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina.
TBS	<i>"Tris-buffered saline"</i> .
TGS	<i>"Tris-glycine-SDS"</i> .
TM	Dominio transmembranal.
TRIS	Tris (hidroximetil)aminometano.
TTBS	<i>"Tween Tris buffered saline"</i> .
UV	Ultravioleta-visible.

SIMBOLOS Y UNIDADES

ϵ	Coeficiente de extinción molar.
λ	Longitud de onda.
ng, μ g, mg, g	Unidades de masa: nanogramos, microgramos, miligramos, gramos.
Da, KDa	Unidades de masa molecular: Dalton, Kilo-Dalton.
μ l, ml, L	Unidades de volumen: microlitros, mililitros, litros.
nm, mm, cm	Unidades de longitud: nanómetros, milímetros, centímetros.
nM, μ M, mM, M	Unidades de molaridad: nanomolar, micromolar, milimolar, molar.
s, min, h	Unidades de tiempo: segundos, minutos, horas.
pb, Kb	Unidades nucleotídicas: pares de bases, kilo-bases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen del proyecto

Se ha sugerido que la proteína tau liberada extracelularmente como resultado de la muerte celular, es tóxica para las células neuronales circundantes. Este efecto se ha propuesto que podría estar mediado por la activación de los receptores muscarínicos de acetilcolina M_1 y M_3 . Sin embargo, no está claro porque es tau, y no otros agonistas muscarínicos nativos como la acetilcolina, quién induce esta toxicidad (Gomez-Ramos, et al., 2006).

Como consecuencia de los efectos reguladores de los receptores muscarínicos en gran parte del sistema nervioso central, se continúa investigando en la línea con el fin de determinar los condicionantes fisiológicos que activan o inhiben estos receptores en presencia de la proteína tau, los cuales pueden llegar a ser clave para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Este trabajo se enfocará principalmente en lograr la expresión y purificación de la proteína tau recombinante, paralelamente se llevará a cabo también la expresión de los receptores muscarínicos M_1 y M_3 . De esta forma se abrirá una línea de trabajo más en el grupo GBMI que debería conducir a la realización de futuros ensayos funcionales entre los receptores muscarínicos y la proteína tau.

1.2. La familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's).

Los GPCR's constituyen la familia más grande de proteínas integrales de membrana y se encuentran en la mayoría de los organismos eucariotas. Es una de las más estudiadas debido a su importancia como diana para la producción de medicamentos contra diversas enfermedades (Schlyer & Horuk, 2006). Los GPCR's han evolucionado para reconocer un gran número de estímulos endógenos y para actuar transmitiendo mensajes codificados en estímulos del exterior al interior de la célula (T.May, et al., 2007). Poseen un gran potencial en el área médica al poder ajustar su actividad como respuesta a la unión de ligandos específicos que desencadenaran respuestas fisiológicas diversas. Actualmente alrededor de un 30-50% de medicamentos que se encuentran en desarrollo tiene como diana un GPCR (Deupi & Standfuss, 2011). Estos receptores celulares regulan respuestas a su interacción con diversas moléculas de señalización como los neurotransmisores, hormonas, péptidos vasoactivos, glucoproteínas y otros mediadores locales.

La mayoría de los receptores de esta clase tienen una estructura similar, consiste en una cadena polipeptídica simple con siete segmentos α -hélice transmembranales que tienen una estructura tridimensional común (Fig.1), por lo que también se les conoce como receptores de siete dominios transmembranales (TM 1-7), estos dominios están unidos entre sí por *loops*: tres

intracelulares (iL1-iL3), un *loop* largo está compuesto básicamente por aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 (iL3), el cuál es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, tres *loops* extracelulares (eL1-eL3) y un segmento N-terminal glicosilado en el dominio extracelular. Se puede formar un cuarto *loop* en el segmento C- terminal debido a la palmitoilación de residuos cisteína en esta región.

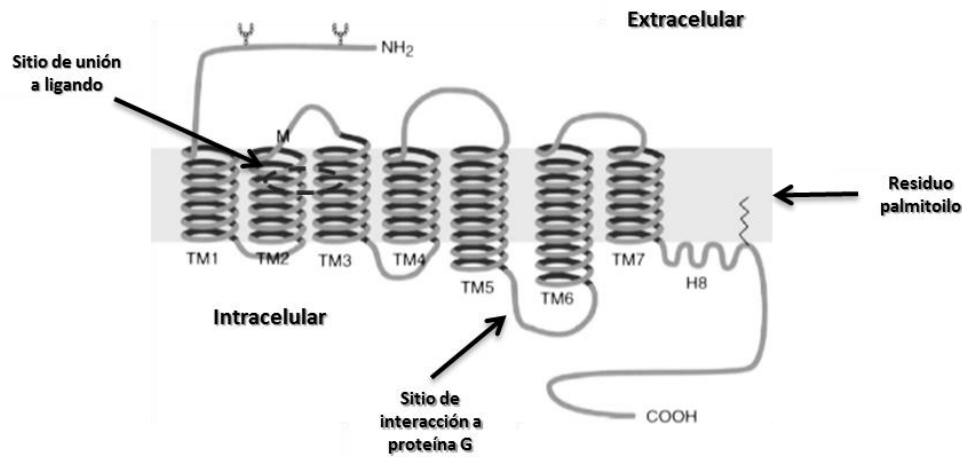


Figura 1. Estructura secundaria de un GPCR.

Inicialmente, se pensaba que la señalización celular mediante GPCR's ocurría únicamente debido a su interacción y activación con diferentes tipos de proteínas de unión a nucleótidos de guanina o proteínas G (Limbird, 1983). Sin embargo, ahora se sabe que además de la señalización dependiente de proteínas G, los GPCR's también activan rutas de señalización independientes de proteínas G (Hermans, 2003); (Lefkowitz & Whalen, 2004). Además, los GPCR's son ahora conocidos por interactuar con muchas otras proteínas intracelulares independientemente de las proteínas G, y estas proteínas juegan cada vez un papel más relevante en la regulación de la señalización por GPCR's (Brady & Limbird, 2002).

Los GPCR's se encuentran agrupados en 5 grupos importantes en base a la similitud existente entre sus secuencias y los dominios transmembranales que poseen. Estos grupos son: receptores de adhesión (24 miembros), receptores de secretina (15 miembros), receptores metabotrópicos de glutamato (15 miembros), receptores frizzled/TAS2 (24 miembros) y por último los receptores de rodopsina (701 miembros).

La familia de receptores semejantes a rodopsina constituye la familia más numerosa e incluye ligandos con gran diversidad estructural. Uno de los rasgos que los distinguen es un conjunto de aproximadamente 20 aminoácidos localizados en la mitad citoplasmática del núcleo del receptor, necesario para la estabilización del receptor y/o para regular los cambios conformacionales que acompañan a la activación del mismo. Esta familia comprende varios subgrupos o subfamilias, entre los que se encuentran los receptores de estímulos sensitivos

(rodopsina, opsinas, etc.), hormonas glucoproteicas (FSH, LH/CG, TSH), péptidos (angiotensina, oxitocina, opioides, etc), aminas biógenas (acetilcolina, dopamina, histamina, serotonina, etc.) y otros receptores diversos.

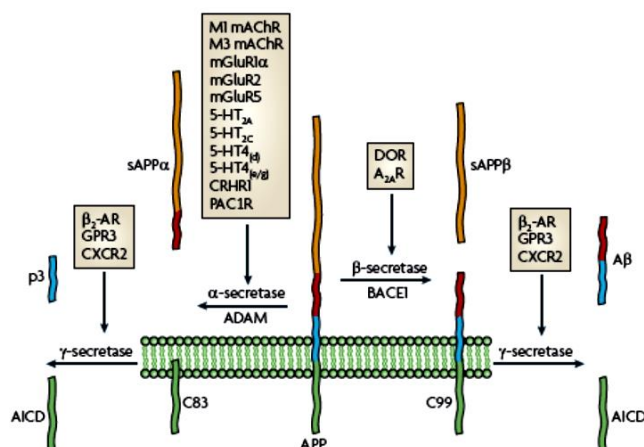
Las proteínas $G\alpha$ de mamíferos se pueden clasificar de la siguiente manera:

Tabla 1. Regulación de las funciones sistémicas de las $G\alpha$ de acuerdo a la cascada de señalización que activan.

Clase $G\alpha_A$	Efecto asociado	Segundo mensajero	Ejemplos de receptores
$G_S\alpha$	Adenilil ciclase	Aumento de AMP_c	β -adrenérgico, serotonina, vasopresina
$G_i\alpha$	Adenililciclase, canal de K^+	Disminución AMP_c , cambio en el potencial de membrana	muscarínico de acetilcolina
$G_{ol}\alpha$	Adenilil ciclase	Aumento AMP_c	Olfatorios
$G_q\alpha$	Fosfolipasa C	Aumento IP_3 , DAG	α_1 -adrenérgico
$G_o\alpha$	Fosfolipasa C	Aumento IP_3 , DAG	Acetilcolina de células endoteliales
$G_t\alpha$	cGMP fosfodiesterasa	Disminución cGMP	Rodopsina de las células bastón

1.2.1. Implicación de los GPCR's en la patología del Alzheimer (AD).

La patología del Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la acumulación de agregados proteicos y de lesiones neurofibrilares, constituidas por pequeños péptidos de 39-43 aminoácidos de longitud conocidos como β -amiloides, provenientes de la proteína precursora de amiloides (APP), esta proteína es indispensable para el crecimiento de las neuronas, para su supervivencia y su reparación post daño (Fig.2). El Alzheimer es un tipo de taupatía debido a la acumulación de agregados anormales provenientes de la hiperfosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos. Actualmente varias de las terapias que se están empleando para el tratamiento de esta enfermedad tienen como diana la acetilcolinesterasa (AChE). Varios estudios demuestran también que la neurodegeneración no se encuentra limitada a sistemas neurotransmisores específicos, es decir, que también los sistemas glutamatérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos, entre otros, son desregulados en esta patología. (Thathiah & De Strooper, 2011).



Receptor	Subtype	Agonist or antagonist	Second messenger	Mode of action	Relevance to AD
mAChR	M1 or M3 mAChR	Carbachol	↑PLC, PKC and DAG ↑PIP2 hydrolysis	α-secretase (unconfirmed)	↑sAPP and ↓Aβ
		AF267B	↑PKC, ERK1 and ERK2 ↓GSK3β	↑ADAM17	↓Aβ ₄₂ and tau No effect on Aβ ₄₀
		AF102B	↑PIP2 hydrolysis	α-secretase (unconfirmed)	↓Aβ
		TBPB	ND	α-secretase (unconfirmed)	↑sAPPα and ↓Aβ ₄₀

mediar en la actividad sináptica del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico, a nivel del sistema nervioso autónomo (SNA).

La ACh es sintetizada por la acetil-CoA y la colina en el citoplasma de la hendidura sináptica (Fig.4). La etapa final de su síntesis es catalizada por la enzima colina acetiltransferasa o colinoacetilasa (CAT). Una vez que se ha formado, la ACh es transportada, empacada en vesículas sinápticas y liberada en el extremo nervioso, donde se unirá a los receptores muscarínicos o nicotínicos, desencadenando la respuesta celular. Una vez terminada su función, la ACh es eliminada gracias a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que al unirse a la ACh la hidroliza en acetato y colina.

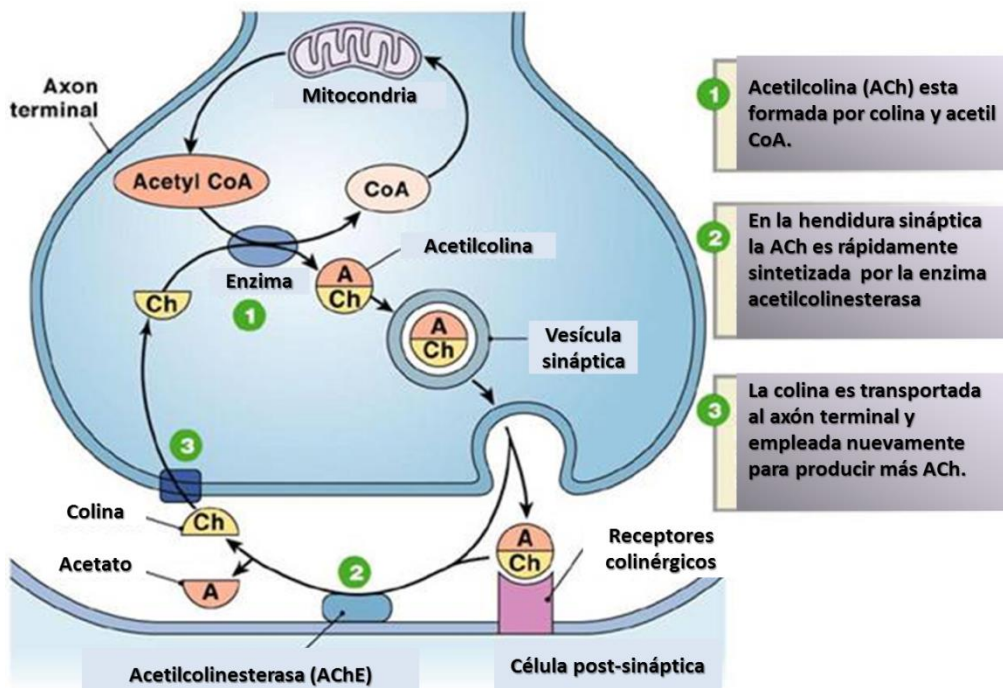


Figura 4. Síntesis de la acetilcolina.

Los receptores de acetilcolina son de gran importancia debido a que un gran número de drogas tienen como blanco este tipo de receptores, el bloqueo de estos se encuentra asociado a efectos anticolinérgicos (parasimpaticolíticos), mientras que la estimulación de los mismos favorece los efectos colinérgicos (parasimpaticomiméticos). Estos receptores se encuentran divididos en dos importantes subclases mencionadas anteriormente: receptores muscarínicos y receptores nicotínicos.

Desde el punto de vista estructural, los receptores muscarínicos son receptores acoplados a proteína G, mientras que los nicotínicos son receptores del tipo de canal iónico. El siguiente esquema (Fig.5) muestra las tres principales ubicaciones de los receptores para acetilcolina.



Figura 5. Localización de los receptores colinérgicos

La neurotransmisión colinérgica a nivel del SNC regula el sueño, la vigilia y la memoria. Dos situaciones clínicas ilustran el papel de la acetilcolina en el SNC:

- Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se utilizan en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. La inhibición de la enzima que cataliza la degradación de ACh (acetilcolinesterasa) produce una concentración aumentada de ACh a nivel sináptico, potenciando de esta manera la neurotransmisión colinérgica.
- Los fármacos con actividad anticolinérgica pueden causar encefalopatías agudas, tales como delirios o estados agudos de confusión. Algunos fármacos de venta libre como la difenhidramina (un antihistamínico) pueden producir un bloqueo colinérgico capaz de provocar una descompensación de déficits cognitivos preexistentes (en particular en pacientes con enfermedad de Alzheimer).

1.3.1. Generalidades: estructura y función.

Los mAChR's, median la mayor parte de las acciones realizadas por el neurotransmisor acetilcolina tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico. En mamíferos se han determinado 5 subtipos, M_1 a M_5 , todos se expresan en humanos. Como se dijo anteriormente, estos receptores pertenecen a la gran familia de los siete dominios transmembranales (TM 1-7). Varían en su distribución así como en la afinidad que muestran a varias proteínas G.

Los receptores M_1 , M_3 y M_5 se acoplan eficientemente a las proteínas G: $G_{\alpha_{q/11}}$ y $G_{\alpha_{13}}$, provocando, por ejemplo, la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D (PLD), mientras que los receptores M_2 y M_4 prefieren acoplarse a proteínas G_i y G_o , produciendo la inhibición de la adenilato ciclasa (Van Koopen & Kaiser, 2003). Respecto a este dato, se sabe que la unión del ligando con los receptores M_1 , M_3 y M_5 conlleva la activación de la PLC que, en último término, lleva a la liberación de calcio intracelular del retículo endoplásmico.

Tabla 2. Distribución en el cerebro de los diferentes subtipos de mAChR's. Modificada de (Levey, 1996).

Subtipo molecular	Abundancia Regional	Localización Celular	Localización Sináptica
M₁	Abundante en cerebro anterior (neo córtex, neo estriado e hipocampo.	Neuronas piramidales y piramidales estriales.	Post ->> Pre-sináptica
M₂	Moderadamente abundante en cerebro.	Neuronas no piramidales en córtex e hipocampo	Pre ->> Post-sináptica
M₃	Bajos niveles en todo el cerebro, pero abundante en hipocampo.	Neuronal	Post ->> Pre-sináptica
M₄	Abundante en neo estriado, moderados en hipocampo y córtex.	Neuronas estriales espinosas.	Pre ->> Post-sináptica
M₅	Bajos niveles en todo el cerebro.	Neuronas piramidales, materia negra, microglia.	¿?

Los receptores M₁ median diferentes funciones fisiológicas como: potenciales excitatorios post-sinápticos en los ganglios simpáticos y parasimpáticos, secreción de glándulas salivales, secreción del jugo gástrico del estómago además puede presentar funciones en el SNC que se encuentran relacionadas con el aprendizaje y la memoria.

De la misma forma el M₃ (Fig.6) es mediador de funciones como la contracción muscular suave y la secreción glandular. Los receptores M₃ centrales también se han implicado en la regulación de la ingesta de alimentos, el aprendizaje y la memoria.

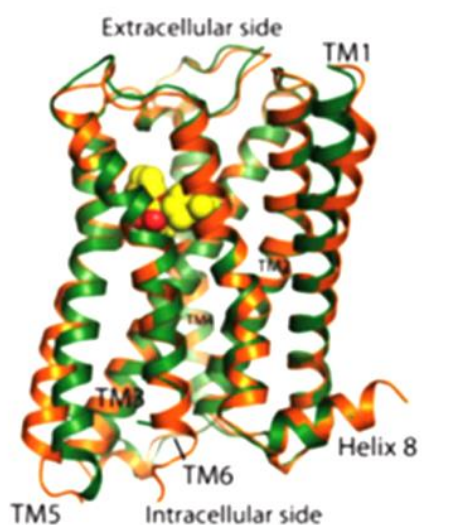


Figura 6. Estructura general del receptor M₃. La mayor parte de la estructura del receptor M₃ (verde) es similar a la estructura del receptor M₂ (naranja). La unión con el ligando, tiotropio, se muestra como esferas coloreadas acordes al elemento, con el carbono en amarillo y el oxígeno en rojo (Kobilka, et al., 2012).

1.4. Proteínas asociadas a microtúbulos: proteína tau.

Los microtúbulos son estructuras tubulares de las células, miden aproximadamente 25nm de diámetro exterior y unos 12nm de diámetro interior. Se localizan en células eucariotas y se forman por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la α y la β tubulina.

Además de ser uno de los componentes principales del sistema cito esquelético, se encuentran involucrados en el mantenimiento de la morfología neuronal y la formación de procesos dendríticos y axonales. Además de su importancia como soporte morfológico y estructural, los microtúbulos son importantes para el tráfico celular al proporcionar un soporte a las proteínas motoras, como las quinesinas y dineínas, para el transporte de carga a partes específicas de las células. Estas sinapsis son altamente vulnerables a presentar deficiencias en el transporte, por lo tanto, cualquier perturbación en el sistema puede provocar un mal funcionamiento en la neurotransmisión y en la propagación de señales que concluirán en una degeneración sináptica (Gendron & Petrucelli, 2009).

Existen otras proteínas denominadas MAP (*"Microtubule Associated Protein"*) o proteínas asociadas a microtúbulos. Se considera que colaboran en el ensamblaje de los dímeros para formar microtúbulos, en la estabilización de estos y en su relación con los microtúbulos adyacentes. Se caracterizan por ser termo-resistentes y se ven poco afectadas por el tratamiento ácido.

Se clasifican en dos grupos, dependiendo de su peso molecular:

- MAP de bajo peso molecular (55-62 kDa): también denominadas proteínas τ (tau). Estas recubren al microtúbulo y establecen uniones con microtúbulos adyacentes.
- MAP de alto peso molecular (200-1000 kDa): Se conocen 4 tipos de MAP diferentes: MAP-1, MAP-2, MAP-3, MAP-4.

1.4.1. Generalidades de la proteína tau: estructura y función.

La proteína tau fue aislada por vez primera en 1975 como una proteína que se co-purificaba con la tubulina y que poseía la habilidad de promover el ensamblaje de microtúbulos *in vitro*. La proteína tau se encuentra codificada dentro del gen MAPT localizado en el cromosoma 17 a una posición de banda 17q21 y contiene 16 exones (Fig.7) (Ávila, et al., 2004). El exón 1 es parte del promotor por lo que es transcrito pero no traducido. Los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13 son exones constitutivos. Los exones 2, 3 y 10 son resultado de un empalme (*alternatively spliced*) y se manifiestan en el cerebro humano adulto. El exón 2 puede aparecer sólo sin embargo el exón 3 jamás aparecerá sin el exón 2. En el SNC, el empalme de los exones 2, 3 y 10 resulta en 6

diferentes isoformas que serán expresadas durante el desarrollo del cerebro (Kolarova, et al., 2012).

Estas isoformas difieren entre ellas por la presencia o ausencia de uno o dos insertos ácidos en la región N-terminal (denominado el dominio de proyección) así como también del contenido de tres (3R) o cuatro (4R) regiones repetitivas de un dominio conservado de unión a tubulina (*tubulin binding domain*) en la región C-terminal (Gendron & Petrucelli, 2009). El número de aminoácidos en las 6 isoformas puede variar de entre 352 hasta 441 residuos, siendo esta última la isoforma más larga encontrada en SNC humano.

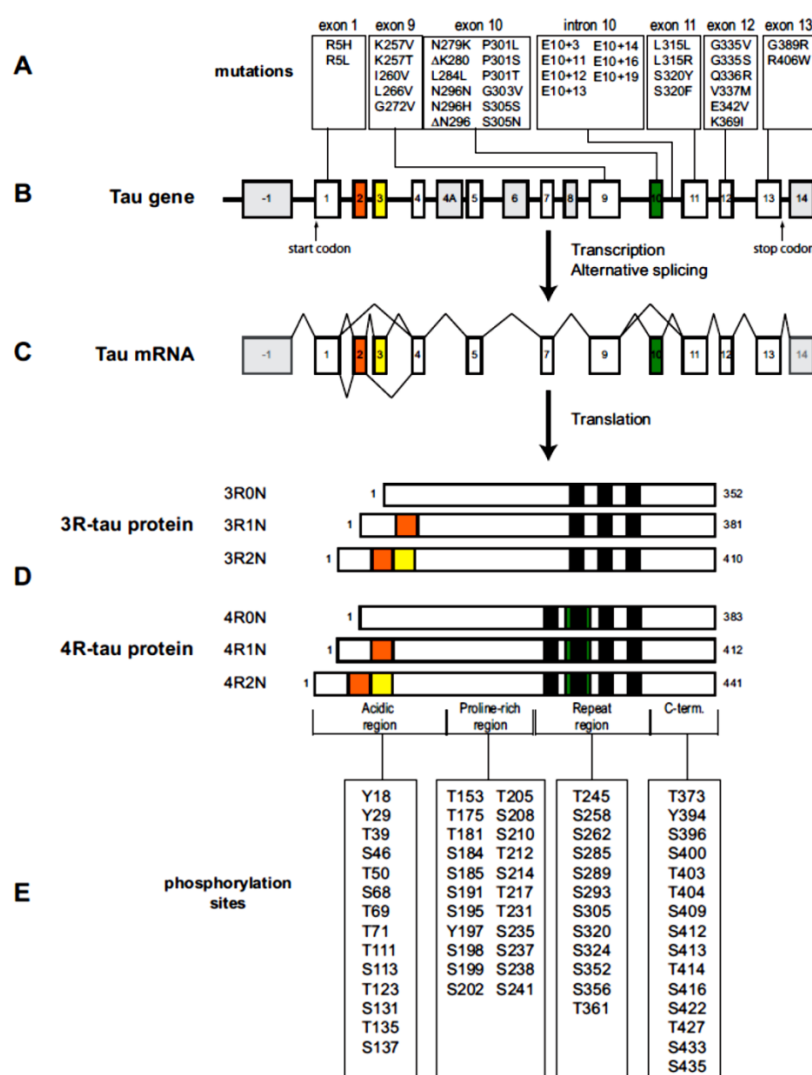


Figura 7. Representación esquemática del gen humano tau, mRNA e isoformas. (A) Mutaciones identificadas en los exones 1-13 y del intrón 10. (B) Gen humano de la proteína tau ubicado en el cromosoma 17q21 conteniendo 16 exones. (C) Exon 1, es parte del promotor por lo que es transcrito pero no traducido, como también el exon 14. (D) Exones 2, 3 y 4. (E) Sitios de fosforilación.

10 son “*alternatively spliced*” generando 6 mRNAs que se traducirán a 6 isoformas diferentes. (E) Sitios reportados que presentan fosforilación “*in vivo*” e “*in vitro*”. (Gendron & Petrucelli, 2009)

Todas las proteínas tau son poli anfóteras débilmente cargadas con un gradiente en la distribución de carga a lo largo de la cadena. Se conoce también que las isoformas de tau son macromoléculas flexibles y poseen varias conformaciones estructurales, debido a su bajo contenido en estructuras secundarias, por lo que aún no se han considerado como candidatas para el análisis de su estructura mediante cristalografía. Varios estudios revelan que tau podría ser una forma original o modelo de una proteína “nativa no plegada”.

Por otro lado, la región N-terminal posee un punto isoelectrico $pI=3.8$ seguido de un dominio rico en prolina, el cual tiene un $pI=11.4$. La región C-terminal se encuentra también cargada positivamente con un $pI=10.8$, es decir, que la proteína tau es más bien un dipolo con dos dominios de carga opuesta, los cuales pueden ser modificados mediante modificaciones post-transduccionales.

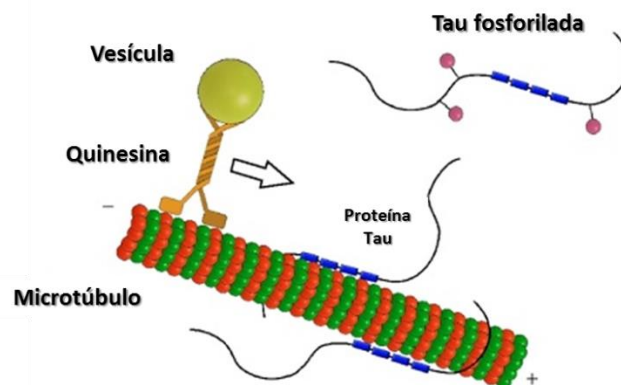


Figura 8. Funcionamiento normal de la proteína tau. Tau estabiliza los microtúbulos a través de sus 4 dominios de unión a tubulina (cuadros azules) en caso de la isoforma más larga de tau. La unión de tau a estos microtúbulos se mantiene gracias al equilibrio proporcionado por varias quinasas y fosfatasas. La fosforilación de tau (círculos rosas) regula su capacidad de unión al microtúbulo y puede afectar el transporte axonal (Kolarova, et al., 2012).

La fosforilación de tau, regula su capacidad para unirse al microtúbulo, por lo que un nivel normal de fosforilación es requerido para su buen funcionamiento (Fig.8). Mientras que la hiperfosforilación (Fig.9) provoca que pierda completamente su actividad biológica, provocando la desintegración del sistema de transporte neuronal llevando así a la degeneración y muerte neuronal.

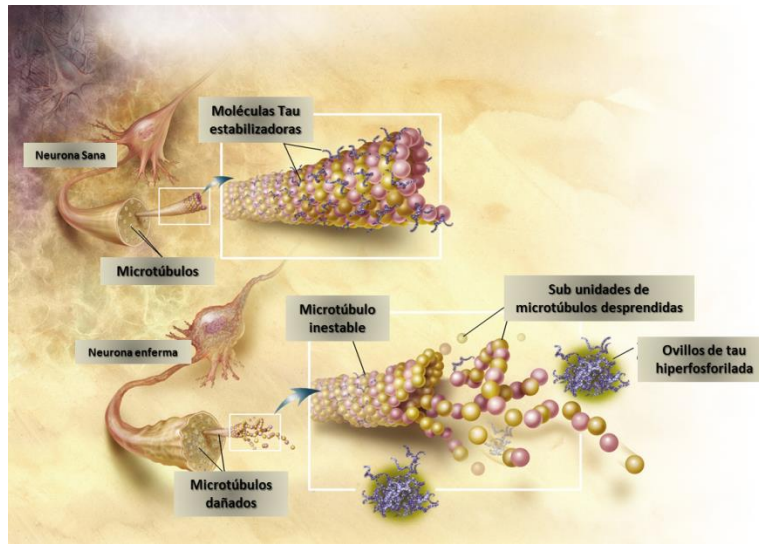


Figura 9. Esquema de la hiperfosforilación de la proteína tau provocando la muerte neuronal. Modificada de ADEAR: "Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging." http://www.nia.nih.gov/NR/rdonlyres/A01D12CE-17E3-4D3D-BCEF-9ABC4FF91900/0/TANGLES_HIGH.JPG

1.5. Posibles interacciones entre la proteína tau y los receptores muscarínicos M_1 - M_3 implicándolos en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer.

Recientemente se ha sugerido que la proteína tau en asociación con los receptores colinérgicos M_1/M_3 , puede jugar un papel relevante en la patología del Alzheimer y de algunos de sus principales síntomas como el declive cognitivo con la edad.

Una de las características principales en esta patología, es que los pacientes presentan en el cerebro la formación de dos tipos de estructuras: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Estos ovillos están formados principalmente de la proteína tau hiperfosforilada y agregada. Este proceso provoca la muerte neuronal y como consecuencia, todos los componentes intracelulares, como la proteína tau en su forma soluble o como ovillos neurofibrilares, son expulsados y encontrados en el espacio extracelular. Se ha sugerido que una vez que la proteína tau se encuentra en el espacio extracelular se convierte en un compuesto tóxico para las neuronas circundantes (Gomez-Ramos, et al., 2006).

Otro mecanismo sugerido para explicar la propagación de esta patología, involucrando a la proteína tau, es que la transmisión de la forma agregada de tau sea entre células, es decir, mediante endocitosis y exocitosis, siendo innecesaria la muerte neuronal (Clavaguera, et al., 2009). También se ha propuesto que la forma agregada de la proteína tau, es la forma tóxica que se propaga, ya que este tipo de transmisión ocurre únicamente en desórdenes

neurodegenerativos y no en situaciones normales de salud (Clavaguera, et al., 2009); (Iba, et al., 2013).

En el caso de muerte celular, esta situación se explica mediante el aumento del calcio intracelular en las neuronas circundantes que interactúan con la tau intracelular, agregada o soluble, cuando es liberada en el espacio extracelular. Este aumento del calcio se puede deber a los canales permeables de calcio, a la activación de receptores en la superficie celular unidos a la entrada de calcio (*calcium-influx*) o a la liberación del calcio almacenado intracelularmente, los cuales son inducidos mediante la activación de los receptores muscarínicos al interactuar con la proteína tau. (Gomez-Ramos, et al., 2006).

Se han evaluado diferentes niveles de agregación de la proteína tau para analizar su interacción con los receptores muscarínicos en sistemas de cultivos celulares de tipo neuronal. Por lo tanto, se han realizado ensayos con agregados de tau, tau soluble conteniendo monómeros y oligómeros, y estos estudios han demostrado que la proteína tau soluble es la que interactúa con los receptores muscarínicos. (Gomez-Ramos, et al., 2006)

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es expresar el receptor muscarínico M₁ y M₃ para su posterior caracterización y análisis, con el propósito de profundizar en la posible interacción de estos GPCR's y la proteína tau. Asimismo se pretende expresar y purificar la proteína tau mediante el uso de diferentes mecanismos de expresión celular.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- Expresar el receptor M1 y M3 en células eucariotas mediante el protocolo de transfección simple en diferentes líneas celulares.
- Expresar la proteína Tau en un cultivo de la bacteria *E.coli* (cepa BL21 (DE3)) analizando diferentes condiciones para establecer la más favorable.
- Purificación de la proteína Tau recombinante mediante la técnica de cromatografía de intercambio catiónico. Una vez purificada la proteína Tau, será posible emplearla para realizar ensayos de interacción con los receptores muscarínicos obtenidos, una propuesta de gran interés farmacológico debido a su posible implicación en la patología del Alzheimer.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo será necesario primero obtener el ADN complementario de la proteína tau (ADNc) para su posterior clonación en un vector con un marcador de selección, en este caso, resistencia a un antibiótico, que permita su expresión en células procariotas. Se deberán analizar diferentes condiciones experimentales para conseguir la más favorable para su expresión y purificación. En el diagrama presentado a continuación (Fig.10) se pueden observar los pasos a seguir en el desarrollo experimental del proyecto.

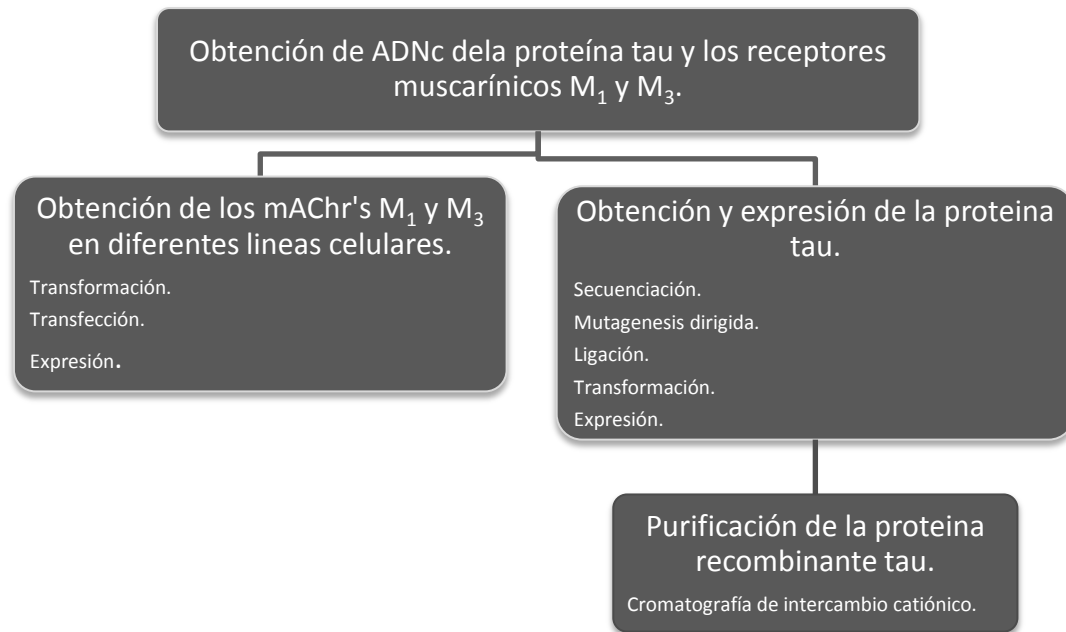


Figura 10. Esquema general del proceso del proyecto.

3.1. Líneas celulares y vectores.

Dentro de las líneas celulares que se emplearán para el desarrollo del proyecto se encuentran las siguientes:

- Células procariota competentes de *E. coli* cepa BL21 (DE3) de Sigma.
- Células procariota competentes de *E. coli* cepa DH5- α de Sigma.
- Células eucariota de riñón embrionario humano, HEK 293T, que contienen el gen *Simian Vacuolating Virus 40Tag (SV40 Large T-antigen)*; permitiendo de esta manera la amplificación y extensión temporal de la expresión del plásmido transfectado.
- Células eucariotas de tipo fibroblasto derivada del riñón de mono, COS-1.
- Células eucariotas de neuroblastoma humano, SH-SY5Y donada por Cristina Gutiérrez Salvador, del Instituto de Neurociencias, Dep. Cultivos de la UAB.

Dentro de los vectores a emplear en el desarrollo del proyecto se encuentran los siguientes:

- Vectores de expresión que contienen el gen que codifica al receptor muscarínico M₁ y M₃, respectivamente, donado por investigadores del GBMI.

- Vector de expresión PRKT42, conteniendo el gen que codifica a la proteína tau, donado amablemente por el Dr. Jesús Ávila, del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM).
- Vector de expresión pET-17b de Novagen®.

3.2. Obtención y purificación de ADNc plasmídico: Proteína tau y receptores M₁-M₃.

La obtención de la proteína tau y de los receptores muscarínicos (M₁-M₃) se llevará a cabo mediante la técnica de ADN recombinante. Empleando esta tecnología es posible obtener y transferir fragmentos o secuencias completas de ADN de un organismo a otro. El material genético se introduce en la célula huésped en forma de plásmidos. Un plásmido es una pequeña molécula circular de ADN, que posee la capacidad de replicarse independientemente del cromosoma de la célula. Los plásmidos poseen varias características interesantes: (a) aislar en grandes cantidades, (b) cortar, dividir e insertarles cualquier pieza de ADN, (c) incorporarlos nuevamente a la bacteria donde se replicarán junto con el ADN nativo y (d) ser aislados nuevamente, obteniéndose billones de copias del ADN que se les insertó.

Al introducirse este ADN recombinante en un organismo, se produce una modificación genética que nos permite la adición de un nuevo ADN de interés al organismo y de esta forma su amplificación de manera natural dentro del huésped. La proteína que se obtiene, no presente en un organismo determinado y producida a partir de ADN recombinante, se conoce como proteína recombinante.

Al proceso de introducir material genético en forma de plásmido dentro de una célula bacteriana se le llama transformación (Fig.11). Es vital que el vector incluya un marcador de selección para comprobar que las células han sido transformadas y que el ADNc fue insertado correctamente, normalmente se emplea la resistencia a un antibiótico como Ampicilina o Kanamicina (amp. ó KN, respectivamente).

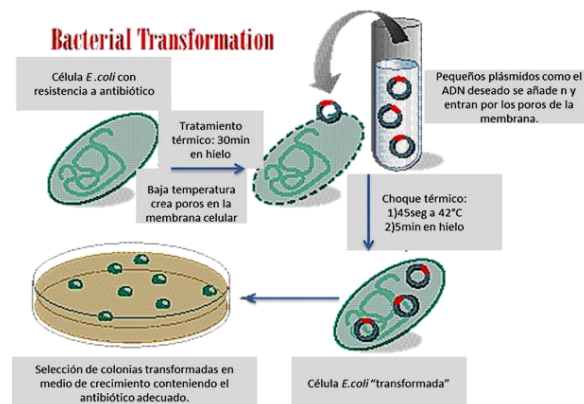


Figura 11. Esquema del proceso de transformación de células mediante choque térmico.

Es importante destacar que todos los protocolos de este proyecto deben realizarse bajo condiciones estériles: trabajar a un costado de la llama con material y medio estéril.

Para este trabajo se llevó a cabo la preparación de un stock propio de ADNc que incluyera los receptores muscarínicos M_1 y M_3 así como la proteína humana recombinante tau. Este stock de ADNc fue obtenido a partir de un protocolo de transformación mediante choque térmico (Fig.12) empleando células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5- α , una vez transformadas con el plásmido deseado (M_1 , M_3 y proteína tau) y habiendo dejándolas en incubación *overnight* (O/N) en una placa Petri con medio LB, se procedió al acondicionamiento de las células para su posterior purificación.

A continuación se presenta el protocolo a seguir para la transformación y selección de células transformadas.

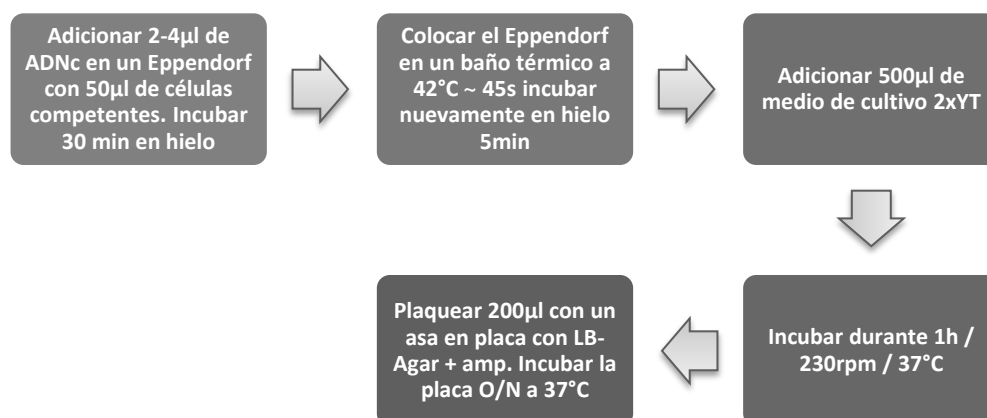


Figura 12. Protocolo de transformación de células competentes mediante choque térmico.

El stock principal, se preparó a partir de un mini-cultivo (Tabla.3) y mediante el kit comercial de **QIAGEN** “*Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Protocol*” se obtuvieron 50 µl de ADNc, posteriormente a partir de un Maxi-cultivo (Tabla.3) y empleando el kit comercial de **Invitrogen** “*PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Protocol*” se obtuvieron 500 µl de ADNc. Todas las ocasiones que fueron necesarias elevadas cantidades de ADNc se siguió el protocolo de la Maxiprep indicado por Invitrogen™.

Tabla 3. Condiciones de crecimiento y preparación de un Mini-cultivo y Maxi-cultivo

Condiciones Mini-cultivo (en un tubo Falcon 15ml)	Condiciones Maxi-cultivo (en un Matraz Erlenmeyer 1L)
6ml medio LB estéril.	500 ml medio LB estéril
6µl amp.	500µl amp.
Se selecciona y pica una colonia. Se añade al medio.	Se prepara un Mini-cultivo. Se añaden 500-1000µl del Mini-cultivo al matraz.
230 rpm	230 rpm
37°C – O/N	37°C – O/N
Centrifugar 20min / 4000rpm	Centrifugar 20min /4000 rpm

3.2.1. Estimación concentración y pureza del ADNc obtenido mediante Maxiprep.

Una vez que se ha purificado el ADNc, se procede a determinar mediante el empleo del espectrofotómetro la concentración y pureza obtenida en cada Miniprep y/o Maxiprep realizada. Se procede a realizar una dilución 1:10 para las Miniprep y una dilución 1:100 para las Maxiprep. Con ayuda del software Cary (100) WinUV y la aplicación SCAN, se mide el espectro de absorción ultravioleta-visible (UV) del ADN en el rango de longitudes de onda (λ) de 200nm a 350nm.

Al ser importante el conocimiento de la concentración y la pureza del ADN obtenido, se tomarán los datos de absorbancia dados por el espectrofotómetro a la λ de 260nm y 280nm. La lectura dada a 260nm nos proporciona la concentración de la muestra mientras que la proporción de las lecturas 260nm/280nm nos permitirá conocer la pureza de la misma.

La ecuación de Lambert-Beer (Ec.1) propone que la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda depende de la cantidad de especie absorbente con la que se encuentra la luz al pasar por la muestra. Tres fenómenos deberán tomarse en cuenta ya que son responsables de la disminución de luz al pasar por la muestra: la concentración del material absorbente, la distancia y el coeficiente de extinción molar del material.

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot L$$

Ec.1

Dónde:

A = la absorbancia medida a una $\lambda=260\text{nm}$.

ε = el coeficiente de extinción molar a una $\lambda=260\text{nm}$.

C = la concentración del material absorbente.

L = la longitud atravesada por la luz (cubeta 1cm).

El coeficiente o factor de extinción molar es un parámetro que define la absorción de la luz a una determinada longitud de onda, por unidad de masa o de concentración molar. De la misma forma se cuenta con la densidad óptica (DO), y se le llama así a la absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada; a veces la misma expresión se usa sin referencia a una longitud de onda específica, y en ese caso debe considerarse sinónimo de absorbancia. Una $DO_{260nm} = 50\mu g/ml$ de ADN doble cadena, $40\mu g/ml$ de ácido ribonucleico (ARN) y ADN de cadena simple y 20 mg de oligonucleótidos, si L es de 1cm. Las preparaciones puras de ADN y ARN poseen un rango de $DO_{260}/DO_{280} = 1.8$ y 2 respectivamente.

Por lo que la ecuación para el cálculo de la concentración de ADN (Ec.2) quedaría de la siguiente manera:

$$C_{ADN} = A_{260} \times 50 \frac{\mu g}{ml} \times factor\ de\ dilución$$

Ec.2

Los parámetros a seguir en el cálculo de la pureza de las muestras son los siguientes:

$$Si \frac{A_{260}}{A_{280}} \begin{array}{l} < 1.8; \text{ indica que la muestra se encuentra contaminada con proteínas.} \\ \geq 1.8 \leq 2; \text{ indica que la muestra es pura o con muy pocos contaminantes.} \\ > 2; \text{ indica que la muestra se encuentra contaminada por ARN} \end{array}$$

3.3. Transfección y expresión de los receptores muscarínicos M_1 y M_3 en diferentes líneas celulares.

El cultivo celular o cultivo de tejidos tiene su origen en el siglo XIX, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones del sistema que se presentan durante el funcionamiento normal del organismo y bajo el estrés de un experimento. Una serie de innovaciones, como por ejemplo, el desarrollo de los requerimientos nutritivos de las células en los medios de cultivo llevada a cabo por Eagle en 1955, el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células por Moscona y Moscona en 1952 y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células "*in vitro*", manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El tipo de cultivo que empleamos se conoce como cultivo celular primario donde las células son capaces de proliferar y la población crece notablemente a los pocos días (Fig.13-14). Cuando las células han ocupado la mayor parte de la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia (48h aprox.).

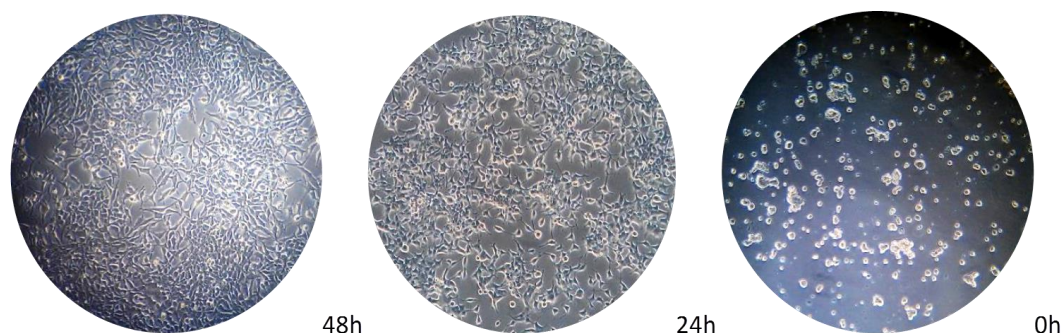


Figura 13. Crecimiento de la línea celular HEK 293T.

Es esta etapa, cuando las células establecen un mayor contacto entre ellas, por lo que comienzan a inhibirse y su crecimiento se detiene. Debido a esta situación, dependiendo la línea celular, será necesario al cabo de un tiempo “transplantar” las células a un nuevo soporte. Esta etapa se conoce como subcultivo o pase. Dependiendo también la línea celular se tendrán más o menos números de pase antes de que las células pierdan sus capacidades esenciales.

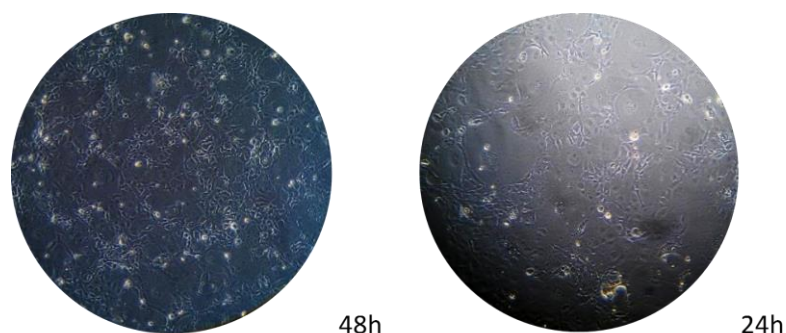


Figura 14 Crecimiento de la línea celular COS-1.

Para la expresión de los receptores M_1 y M_3 se trabajará con dos líneas celulares importantes: HEK 293T y las COS-1, dependiendo los resultados obtenidos se puede proponer el uso de una tercera línea celular que también se ha empleado dentro del GBMI: COS-7.

Para la expresión de la proteína tau se recibió una línea celular nueva para el GBMI proveniente de neuroblastoma humano (Fig.15), SH-SY5Y, sin embargo hasta este punto del proyecto ha sido complicado estandarizar el protocolo de mantenimiento y crecimiento de la misma.

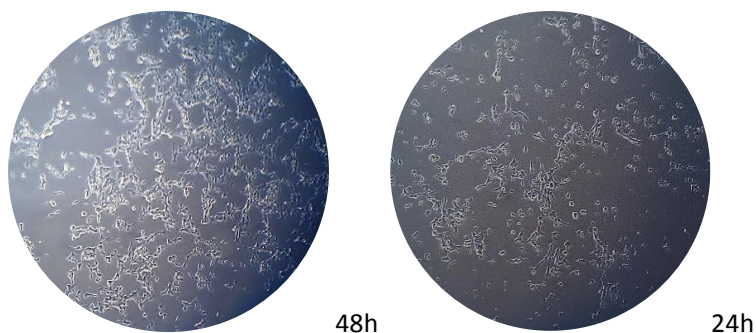


Figura 15 Crecimiento de la línea celular SH-SY5Y.

3.3.1. Mantenimiento celular y transfección.

Las células HEK 293T y COS-1 se cultivaron en placas de la casa comercial Nunc™ (100mm*20mm) y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂. Se preparó 500ml de medio DMEM (*"Dulbecco's Modified Eagle's Media"*) suplementándolo con los aditivos mostrados en la Tabla.4 previamente calentados. Este medio se mantuvo a 4°C mientras no se empleaba y cada vez que se necesitó debió calentarse a 37°C, prepararse CUIDADOSAMENTE y en condiciones estériles dentro de la cámara de cultivos NUAIRE™ (Fig.16).

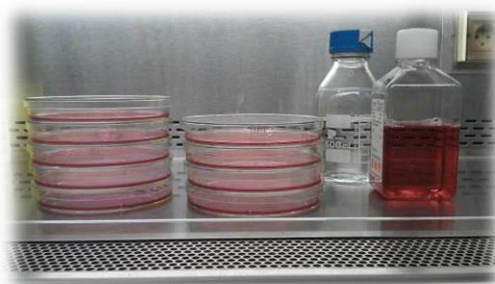


Figura 16. Subcultivo celular: de 3 placas a 9 placas en medio DMEM suplementado con FBS.

Una vez que las placas alcanzaron una confluencia celular superior al 80-90% (aproximadamente a las 48h de realizado el subcultivo), se procedía de dos maneras:

- 1) Realizar nuevamente un subcultivo celular o pase, para el cual primero se retiró el medio anterior, se re suspendieron las células en 5ml de medio DMEM nuevo, por placa, pipeteando de arriba abajo varias veces hasta desprender en su totalidad las células. Una vez que se tenían las células desprendidas, los 5 ml se mezclaban con 40ml de medio fresco (45ml totales), siguiendo una relación 1:3 se añadieron 15ml del medio con células + 5ml de medio fresco.

- 2) Preparar las placas para transfección, por lo que primero se aspiró el medio anterior, y se procedió a realizar un lavado con solución salina tamponada, PBS1X, (*"Phosphate buffered saline"*) añadiéndolo cuidadosamente sobre la pared de la placa, una vez lavadas las placas, se adicionaron 15ml de medio DMEM fresco y se colocaron en la incubadora para su posterior transfección con las soluciones que contenían los ADNc de cada uno de los receptores muscarínicos (M_1 y M_3).

Tabla 4. Composición del medio de crecimiento líneas celulares: HEK 293T y COS-1

Medio crecimiento células eucariotas	
DMEM	500ml
FBS 10% (10XStock)	50ml
Pen/Strep 1% (100XStock)	5ml
L-Glutamina 1% (100XStock)	5ml

Estos receptores se transfectaron en un mínimo de 8-10 placas para los ensayos de expresión siguiendo el protocolo detallado más adelante, sin embargo debe tenerse en cuenta que de requerirse mayor cantidad del receptor para realizar otro tipo de ensayos, por ejemplo para purificación o ensayos de ligando radioactivos, será necesario aumentar el número de placas a transfectar. La mezcla de transfección se prepara empleando las proporciones/placa detalladas en la Tabla.5, es importante preparar las placas a transfectar previamente o durante el tiempo de incubación de las soluciones.

Tabla 5. Preparación soluciones de transfección

Solución A (tubo Falcon de 50ml)	Solución B (tubo Falcon de 50ml)
2.5 ml Opti-MEM™	2.5ml Opti-MEM™
100μl de PEI (Stock 1mg/ml)	30μg de ADNc de M_3 /M_1
<p>Una vez preparadas las soluciones A y B, se incubaran durante 5 min. Transcurrido este tiempo se añade la solución A dentro la solución B y se incuban 20min más.</p> <p>Una vez pasados los 25min se comienza la transfección añadiendo cuidadosamente 5ml de la solución final a la placa confluyente.</p>	

También es importante tomar en cuenta el tipo de línea celular con la que se trabajará, puesto que para las células de tipo COS-1, es necesario añadir tripsina para lograr separar las células de la placa y poder subcultivar de manera más sencilla. Esta etapa se conoce como

“tripsinización”. Esta técnica permite, como se mencionó antes, separar las células de su soporte mediante una enzima, la tripsina, que rompe las uniones de las células al soporte o placa, así como las uniones entre las células. Este proceso debe realizarse con sumo cuidado ya que la tripsina también es capaz de destruir las células por digestión total.

Una vez que las células COS-1 han llegado al 80-90% de confluencia se procede de la siguiente manera:

- 1) Aspirar el medio anterior con una pipeta de cristal Pasteur esterilizada previamente.
- 2) Anadir sobre la pared de la placa 10ml de PBS1X. Rotar cuidadosamente la placa, con la finalidad de lavar la superficie de las células y así poder retirar el medio restante.
- 3) Aspirar los 10ml de PBS1X asegurándose no queden trazas de medio (el FBS inhibe a la tripsina).
- 4) Añadir 4.5ml de PBS1X + 0.5ml de tripsina. Incubar por 3-10min o hasta que logre observarse que las células se han despegado.
- 5) Añadir 10ml de medio fresco DMEM suplementado para detener la reacción y obtener la dilución deseada.
- 6) Se siembran 3 placas con la dilución obtenida, 5ml/placa + 15ml medio DMEM fresco.

3.3.2.Recolección y conservación de células transfectadas.

Una vez transcurridas 48h de realizada la transfección de las placas con los receptores M₁ y M₃, se recolectó el medio y las células fueron lavadas con 10ml de PBS1X frío, desprendiendo cuidadosamente con la pipeta las células adheridas sobre la placa. Se almacenaron en tubos Falcon de 50ml o tubos para centrifuga de 250ml, dependiendo la cantidad con la que se trabajó. Para recolectar la mayor cantidad de células se empleó una espátula debidamente lavada y se procedió a “raspar” cada placa añadiendo 10ml más de PBS1X. La re-suspensión total del medio, células y PBS1X, se centrifugó durante 20min a 4000g y 4°C. El sobrenadante fue descartado y el lavado se repitió por segunda ocasión, ahora con un máximo de 30ml de PBS1X en un Falcon de 50ml, para asegurar la remoción total de medio, evitando así posibles interferencias en ensayos posteriores.

Por último, se procedió a etiquetar debidamente cada tubo Falcon, y de no ser procesadas las muestras inmediatamente, se almacenaron a -80°C.

El protocolo para extraer los receptores muscarínicos del sedimento celular se realiza empleando el detergente DM (“*n-Dodecyl-β-D-Maltoside*”) al 1%, el cual es un detergente no iónico actualmente empleado en el aislamiento de proteínas hidrofóbicas de membrana al conservar mejor su actividad que con otros detergentes. Esto nos permite tener una mayor estabilidad y funcionalidad de nuestros receptores. Este proceso de lisado se detalla a

continuación: se re suspendieron las células transfectadas en 1%DM + 1ml PBS1X frío/placa transfectada y se incubó esta preparación 1h a 4°C con agitación suave. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 20min a 4000xg y 4°C.

Se guardó el sobrenadante a -80°C de no ser procesado inmediatamente para su análisis electroforético, protocolos detallados en el apartado 4.6.

3.4. Obtención de la proteína humana recombinante tau en *Escherichia coli*.

En este proyecto uno de los puntos principales es lograr la expresión y purificación de la proteína recombinante tau en una línea celular procariota para facilitar futuros ensayos dentro del GBMI. Por lo que se partió del vector PRKT42 (Anexo i), de aproximadamente 4500 pb, que contiene el gen que codifica a la proteína tau (donado por el Dr. Jesús Ávila, CSIC-UAM).

Sin embargo, tras varios ensayos, se detectó que este vector no permite la expresión de la proteína en una célula procariota por lo que a partir del mapa del vector y a la información dada por el grupo del Dr. Jesús Ávila, se procederá mediante las tecnologías del ADN recombinante, con las cuales es posible aislar y manipular un fragmento de ADN de un organismo para introducirlo en otro, obtener la secuencia de nucleótidos que componen el gen, así mismo será posible corroborar las enzimas de restricción necesarias para aislar el fragmento que codifica el gen completo de la proteína tau y posteriormente insertarlo en un nuevo vector.

3.4.1. Secuenciación y diseño de *primers*.

La secuenciación del ADN es la determinación de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. Se usan dos técnicas principales de secuenciación: una implica métodos enzimáticos y la otra métodos químicos. En nuestro caso solo será necesario diseñar los *primers* o cebadores necesarios para realizar la secuenciación, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- a) Longitud del *primer*: aprox. 18≈25 nucleótidos.
- b) T_m (temperatura de *melting*): 60-80°C
- c) Especificidad: la longitud del primer afecta su especificidad.
- d) Complementaridad de secuencias: baja formación de dímeros o plegamientos.
- e) Contenido G/C: entre 45-55%
- f) Extremo 3'. Colocar G-C en el extremo para asegurar la unión del primer al *template*.

Cada *primer* se analizó mediante el empleo del siguiente software online: IDT (*Integrated DNA Technologies*) <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Tabla 6. *Primers* para secuenciar gen de la proteína tau

Primers diseñados		
T42 FW1	5'	3' CCA AGA GGG TGA CAC GGA C
T42 FW2	5'	3' GCT CCC CAG GCA CTC CCG G
T42 REV	5'	3' GCA GCC TGC TTG CCG GGA G

Una vez diseñados los *primers* se deben preparar las muestras (Tabla.7) que serán enviadas para secuenciación de acuerdo a los requisitos solicitados por el Servicio de Genómica Bioinformática del IBB-Parque de investigación de la UAB, en Bellaterra, Barcelona.

Tabla 7 Condiciones muestras de *primers* y ADN *template* para secuenciación.

ADN <i>template</i> Vol _{min} : 10µl	Primers Vol _{máx} : 100µl
100 ng/µl dil.en H ₂ O mQ	5µM

Teniendo la secuencia completa, es posible observar qué sitios de restricción son los necesarios para obtener el fragmento completo del gen y para poder insertarlos en el nuevo vector: BamHI y EcoRI. Sin embargo el sitio de restricción al final del gen (EcoRI) se encontraba con una “*mutacion silenciosa*” en un codon, es decir, un cambio en los tripletes que codifican a un aminoácido específico sin alterar la función de la proteína, por lo que la enzima no será capaz de reconocer la secuencia.

Es por eso que será necesario el diseño de *primers* para sustituir esos nucleótidos.

3.4.2. Mutagénesis dirigida por PCR.

En 1985, el químico Kary Mullis desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método ha permitido la amplificación exponencial de una molécula de ADN, al generar millones de copias de un fragmento. Esto se debe a la presencia de oligonucleótidos que contienen un grupo extremo 3' libre, el cual es complementario con la cadena molde de ADN. Los “oligos” funcionan como punto de inicio para la adición de nucleótidos y para copiar la cadena molde en la PCR. Una vez que el oligonucleótido se une a su blanco, la polimerasa de ADN puede seguir extendiendo la hebra complementaria. En una reacción típica de PCR se usan dos oligonucleótidos que flanquean la región de ADN que se desea amplificar (Fig.17).

El número de copias del fragmento de ADN que se encuentra entre los dos oligonucleótidos se amplifica con varios ciclos de reacción (Mullis, 1990). Cada ciclo de una reacción de PCR consta de tres pasos:

- 1) Desnaturalización de las cadenas DNA.
- 2) Temperatura de alineamiento.
- 3) Extensión de la cadena de ADN.

La mutagénesis dirigida, es una técnica de biología molecular utilizada para crear mutaciones puntuales en una región de la cadena de ADN. Uno de los requisitos indispensables para llevar a cabo esta técnica es el conocimiento de la secuencia de ADN que se desea mutar.

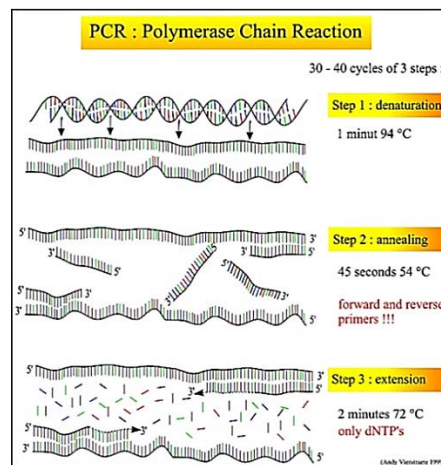


Figura 17. Esquema representativo de la reacción de la PCR.

En nuestro caso es necesario diseñar únicamente dos *primers* que permitan la sustitución de un nucleótido, sin afectar la traducción al aminoácido que codifican. Es importante tomar en cuenta algunos puntos al diseñar los *primers* que se emplearán para introducir este tipo de mutación, como:

- 1) Longitud del *primer*: aprox. 25≈35 nucleótidos.
- 2) Contenido G/C: entre 45-55%.
- 3) Extremo 3' y 5': Colocar G-C en el extremo para asegurar la unión del primer al *template*.

Una vez diseñados, se analizaron con el siguiente software online: PrimerX <http://bioinformatics.org/primerx/index.htm>. El cual ofrece una selección de opciones del *primer* diseñado, es importante señalar que este tipo de programas son aproximados (Fig.18).

Primer pair 2	
**	
Forward: 5'	CGTGGAGAGGAGAGAATTTCGAGAGTGTGGAAGATC 3'
Reverse: 5'	GATCTTCCACACTCTCGAATTCTCTCCTCTCCACG 3'
**	
GC content: 51.43%	Location: 1352-1386
Melting temp: 77.1°C	Mismatched bases: 2
Length: 35 bp	Mutation: Substitution

Figura 18. *Primers* diseñados mediante el programa PrimerX.

Una vez que la PCR se ha llevado a cabo correctamente, es posible realizar las digestiones necesarias para obtener el fragmento que contiene el gen que codifica a la proteína tau así como también el fragmento del vector donde se introducirá el gen.

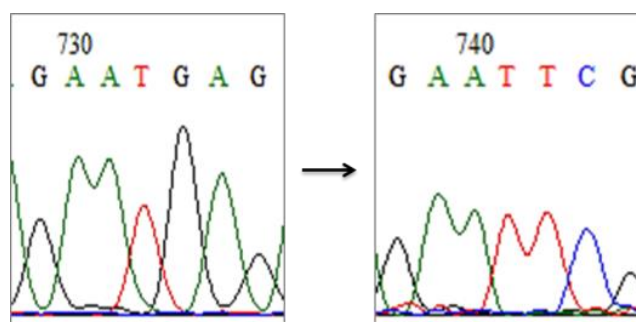


Figura 19. Mutación dirigida del sitio de restricción EcoRI en la secuencia del vector PRKT42.

El procedimiento para la mutagénesis dirigida por PCR a seguir para obtener dichos resultados se muestra en el esquema de la Fig.20, así como las condiciones de preparación de la reacción de la PCR, empleando la polimerasa de Stratagene “*PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase*”, se encuentran en la Tabla 8. Es importante tener la adecuada concentración de ADN y de los *primers* con la que se debe trabajar.

Concentración de *primers*: 125ng/μl en 100μl de H₂O mQ.

Concentración ADN *template*: 25ng/μl.

Tabla 8. Condiciones de preparación de *primers*, ADN *template* y de la reacción de PCR.

Condiciones de reacción para PCR	
Primer FWEcoTau	1μl
Primer REVEcoTau	1μl
ADN <i>template</i> (25ng/μl)	Depende [ADN] stock.
Buffer 10X	5μl
dNTP	1μl
Stratagene PfuTurbo	1μl
H ₂ O mQ	A completar a 50μl

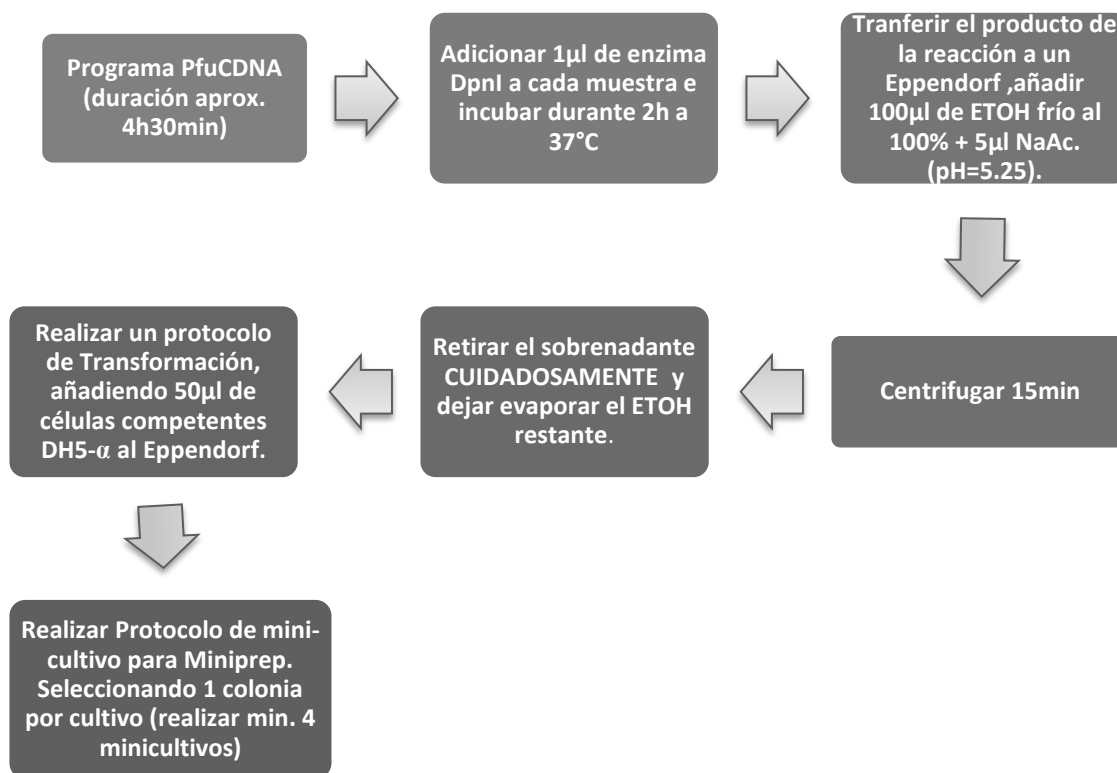


Figura 20. Protocolo para realizar una mutagénesis dirigida por PCR.

3.4.3. Enzimas de restricción y métodos electroforéticos para separar fracciones de ADN.

Las enzimas de restricción son también conocidas como endonucleasas, estas enzimas cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen. Las mismas permiten cortar DNA de hebra doble, donde reconocen secuencias palindrómicas. Varias enzimas permiten su inactivación una vez concluida la digestión, mediante calentamiento, aunque la mayoría de los investigadores prefieren purificar el producto de la reacción antes de continuar con la etapa de ligación. Las enzimas pueden producir dos tipos de cortes: cohesivos y romos. En nuestro caso, las enzimas EcoRI y BamHI producirán terminaciones cohesivas (Fig.21). Estas terminaciones de cadena simple se tendrán tanto en el gen de la proteína tau como en el vector donde se insertará.

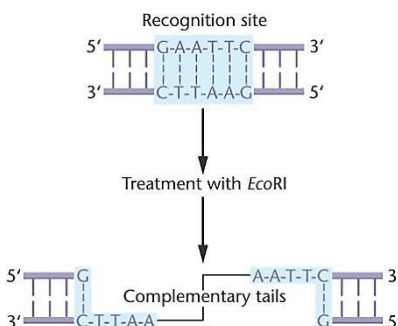


Figura 21. Sitio de reconocimiento de la enzima *EcoRI*.

Las condiciones de la reacción de digestión para un $V_T=20\mu\text{l}$ se muestran en la Tabla.9. La reacción se realizará en micro tubos Eppendorf incubando durante 2h a 37°C .

Tabla 9. Protocolo de digestión de ADN con enzimas de restricción.

Condiciones digestión enzimática
χ μl de ADN
1 μl de Buffer 10X
1 μl Enzima
χ μl de H_2O MilliQ

El protocolo para purificar los fragmentos de ADNc del inserto, así como también del vector a utilizar, que se empleó fue de la casa comercial GE Healthcare “*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (Fig.22).

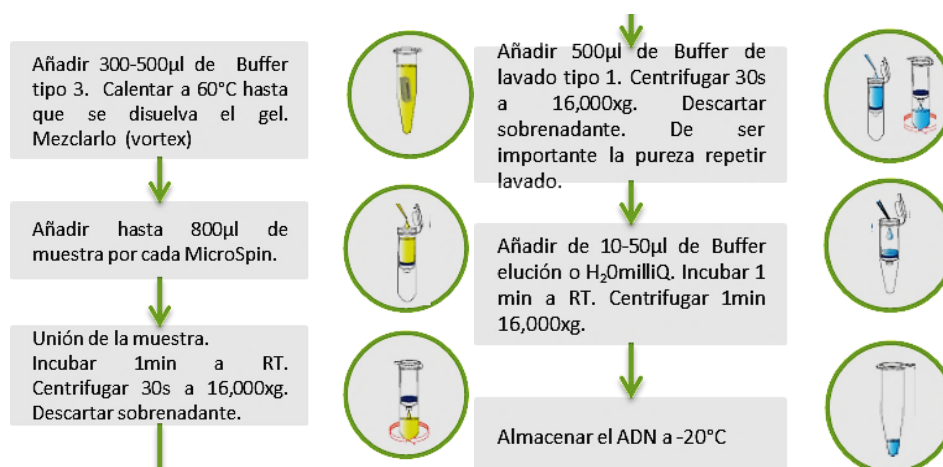


Figura 22. Esquema purificación ADN: “*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”

La electroforesis en gel es un método empleado para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Los nucleótidos y ácidos nucleicos poseen grupos ionizables, y a un pH determinado, existen en solución cargados negativamente (aniones) o positivamente (cationes). Según la naturaleza de la carga neta, migrarán hacia el cátodo o ánodo. Por lo tanto, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Westermeier, 1997).

En esta parte del trabajo se empleará solo un tipo de electroforesis en gel: La electroforesis en geles de agarosa, es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN, así como también permite localizar al ADN tiñéndolo con una concentración baja de bromuro de etidio (manejado cuidadosamente), el cual es un agente intercalante fluorescente que se utiliza para la detección del ADN.

Para la electroforesis de ADN en gel de agarosa se seguirá el protocolo representado en el esquema (Fig.23). Se empleará el marcador comercial de Invitrogen “Kb DNA Ladder” el cual permite diferenciar fragmentos de 250bp hasta 12Kb y se preparará el Buffer TAE10X como lo muestra la Tabla.10.

Tabla 10. Composición del Buffer TAE10X.

Buffer TAE10X	
Tris Base	48.4g
Ácido acético glacial	11.4ml
EDTA	3.7g
H₂Odestilada	Aforar a 1L
Disolver el Tris, el ácido acético glacial y el EDTA en 800ml de agua destilada. De ser necesario emplear agitación mecánica. Una vez disuelto, aforar a 1L. No es necesario esterilizar.	

Esta solución amortiguadora deberá ser diluida para su uso. Diluir 100ml de Buffer TAE10X en 900ml de H₂O destilada. Una vez preparado el Buffer TAE1X, se procede a preparar CUIDADOSAMENTE la solución de bromuro de etidio (BrET.), es importante que los materiales empleados para su preparación sean desechados en contenedores especiales debido a la toxicidad de este compuesto.

Solución de BrET: 100ml de Buffer TAE1X + 3µl de Bromuro de etidio.

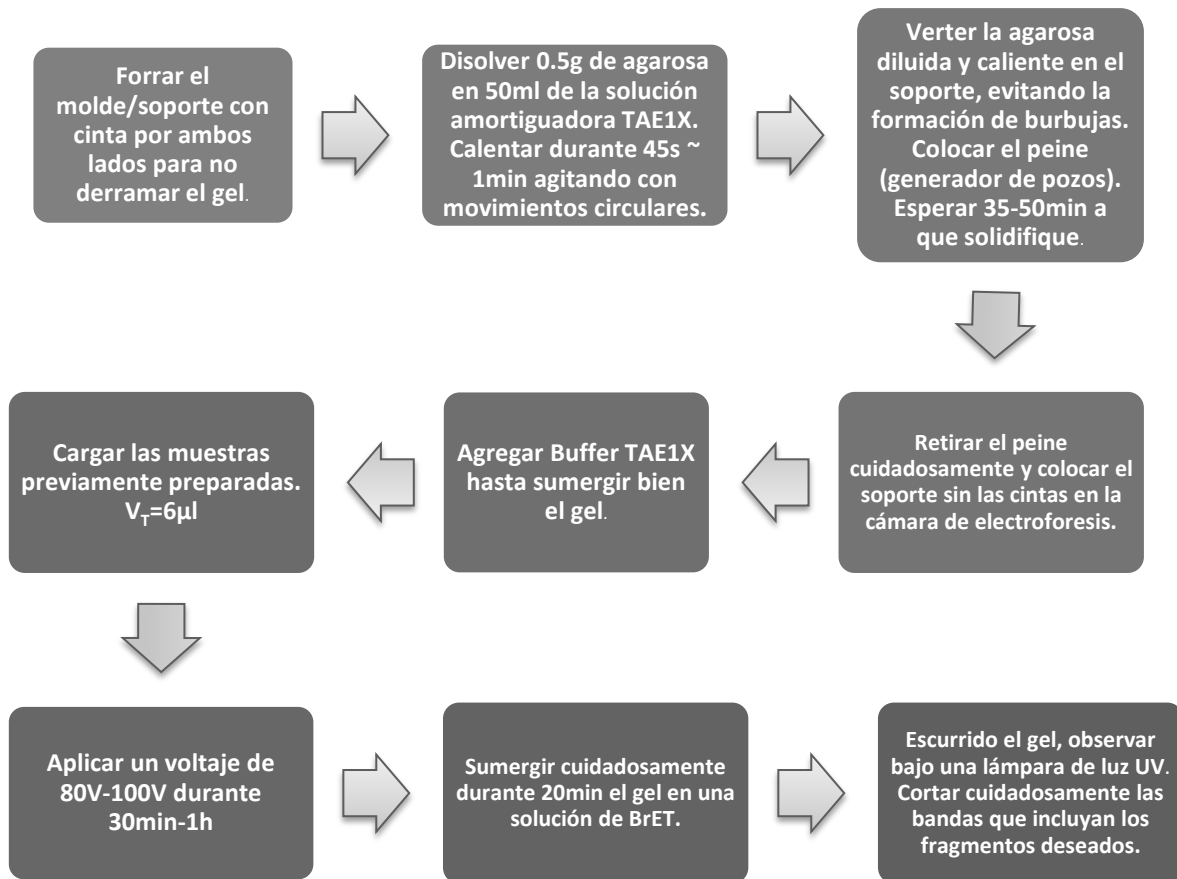


Figura 23. Protocolo para electroforesis de ADN en geles de agarosa.

3.4.4. Ligación vector pET-17b-gen tau

El último paso para construir un plásmido recombinante es la conexión entre el inserto (gen completo o fragmento) y el esqueleto de un vector compatible, previamente digerido y purificado, al unirse covalentemente los esqueletos de azúcares que componen los dos fragmentos de ADN. Esta reacción se conoce como ligación, y se produce gracias a la enzima T4 ADN ligasa (Fig24). Esta ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster, los cuales de manera natural mantienen siempre unidos a los nucleótidos. Una vez obtenido una reacción de ligación exitosa es posible continuar con la transformación del vector completo a células competentes para su propagación.

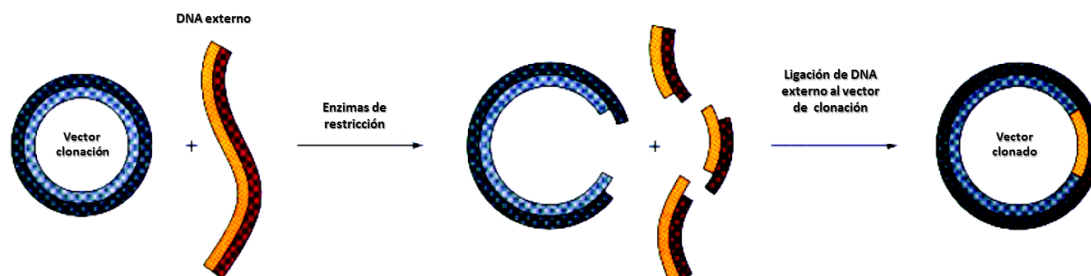


Figura 24. Esquema general de un proceso de digestión enzimática y ligación de fragmentos (ADN + Vector).

Las condiciones necesarias para realizar un protocolo de ligación se muestran en la Tabla.11. Se debe realizar un tratamiento al vector que se utilizará en la ligación con fosfatasa alcalina, durante 2h a 37°C, con el fin de disminuir las posibilidades de re-ligación en el mismo vector. Al término de este tratamiento es importante inactivar la enzima y proceder a purificar nuevamente el vector. Una vez colocados los reactivos en mini tubos Eppendorf's, se coloca dentro del termociclador empleándose el programa llamado LIGATION. Este proceso se realiza por duplicado, donde uno de los mini tubos no llevará la T4 ADN ligasa, siendo por lo tanto un control. El producto obtenido en la ligación se deberá transformar en 50µl de células competentes DH5α, una vez obtenidas las colonias, se deberá realizar el Protocolo de mini-cultivo para Miniprep. Seleccionando y picando una colonia por cultivo (realizar min. 6 minicultivos).

Tabla 11. Protocolo de Ligación.

Condiciones reacción de Ligación
10ng vector
30ng inserto
1µl ATP (10mM)
1µl Buffer Ligación 10X
1µl T4 ADN Ligasa
χ µl H ₂ O

El vector pET-17b de Novagen®, posee un tamaño aproximado de 3306 pb (Anexo i). Una vez realizada la ligación es importante secuenciar nuevamente los productos de la Miniprep con el fin de asegurar que la ligación se ha realizado correctamente. Una manera rápida de comprobación que se empleó en este trabajo, mientras se esperaban los resultados de la secuenciación por el Servicio de Genómica Bioinformática de la UAB, fue realizar digestiones enzimáticas con los 6 productos; es decir, se procedió escogiendo 1 o 2 enzimas que cortaran el vector y el gen insertado. La enzima empleada fue HindIII, una vez transcurrido el tiempo de

incubación, se prosiguió con el protocolo para electroforesis de ADN en geles de agarosa detallado anteriormente (Fig.23).

3.4.5. Transformación, inducción y expresión.

Una vez que se ha conseguido que la ligación funcione, se tiene un vector que se conocerá como pET17b-TAU de aproximadamente 4661 pb (Fig.25), el cual posee los elementos necesarios para asegurar su transcripción y posterior traducción a la proteína. Como por ejemplo, un sitio de origen de replicación autónomo (ORI), un sitio de clonación múltiple (MCS, “multi cloning site”) que como su nombre lo indica contiene dianas únicas para diferentes enzimas de restricción permitiéndole de esta forma la introducción del ADN que se desee clonar. Además, contiene el gen que codifica la resistencia al antibiótico ampicilina (amp^R) que se utilizará como marcador de selección una vez transformada la célula huésped.

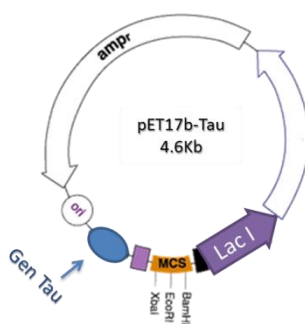


Figura 25. Esquema general del plásmido pET17b-Tau.

La cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* fue seleccionada como célula huésped debido a que posee capacidades que favorecen, facilitan y permiten una mayor eficiencia en la expresión y purificación de la proteína tau. Es uno de los sistemas de expresión mayormente utilizados debido a que es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas.

En este caso concreto, la cepa huésped de expresión contiene en su genoma el ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa, regulado por el promotor lacUV5, cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Fig.26). En este sistema, el vector de expresión pET utilizado para la expresión de la secuencia codificante de la proteína Tau, incorpora una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, de manera que tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector.

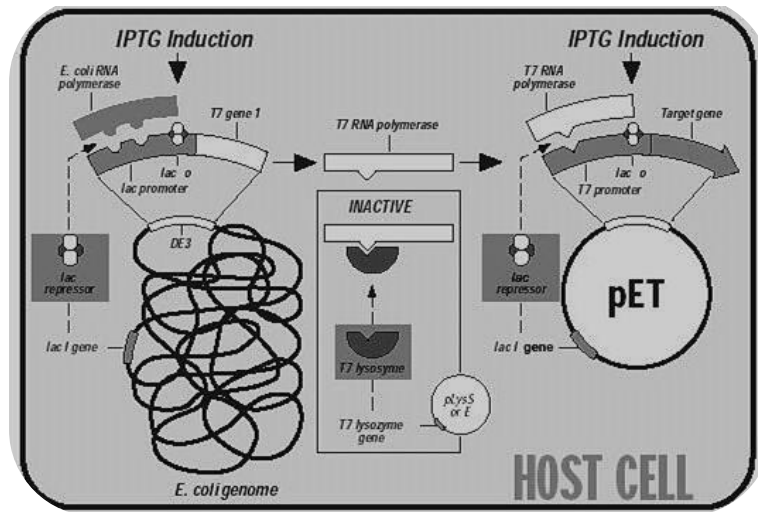


Figura 26. Esquema del sistema pET en células E.coli.

La inducción se realizará en la fase exponencial de crecimiento celular para así optimizar la producción de la proteína deseada.

A partir de la Miniprep proveniente de la ligación y corroborando el resultado de los geles de agarosa con la secuenciación del vector + inserto (pET17b-TAU) se procede a realizar una transformación con células BL21 (DE3), empleando el protocolo descrito en la Fig.12. Al día siguiente debe haberse obtenido una placa con crecimiento de colonias bacterianas resistentes a la ampicilina (cultivo en medio solido).

El medio de cultivo LB es rico en nutrientes como sales, aminoácidos y glúcidos necesarios para el desarrollo y reproducción de las bacterias. Concretamente, 1 litro de medio LB contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio a pH 7. El antibiótico ampicilina es el marcador de selección en nuestro caso.

Los protocolos de crecimiento bacteriano, inducción y expresión de la proteína tau se encuentran detallados en las Fig.27-28.

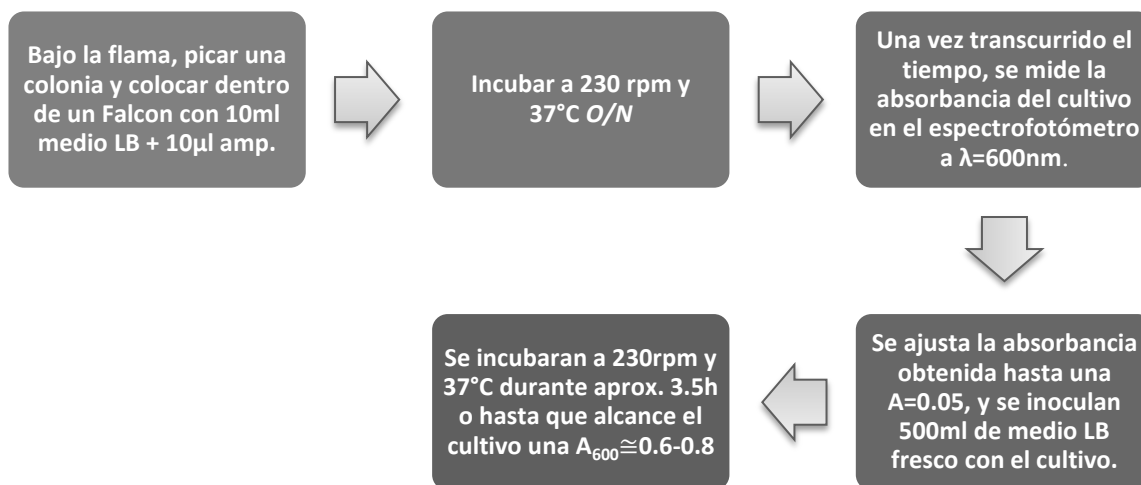


Figura 27. Protocolo cultivo en medio líquido.

Este protocolo también se puede realizar a menor escala, añadiendo una colonia en un cultivo inicial de 5ml de medio LB + 5µl amp (incubar a 37°C y 230rpm, O/N). Una vez trascurrido el tiempo, leer la DO a una dilución de 1/5, añadir los µl necesarios a 10ml de medio LB fresco e incubar por 2-3h hasta alcanzar $A_{600}=0.8$.

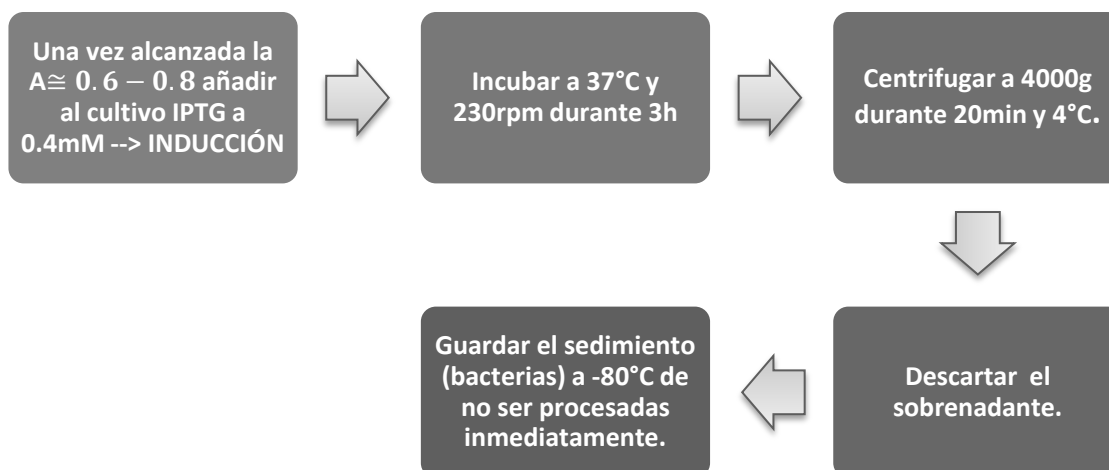


Figura 28. Protocolo para la inducción de un cultivo celular.

Con el objetivo de analizar las mejores condiciones para la expresión de la proteína tau, se decide hacer diferentes condiciones de crecimiento: 37°C-O/N, RT-O/N y 16°C-O/N.

De la misma forma se analizan las condiciones de inducción, por lo que una vez comenzada se toman alícuotas a los tiempos 0 h, 1.5 h, 3 h y O/N para determinar la absorbancia y hacer controles electroforéticos del proceso en geles de SDS y *Western Blot* (ver apartado 4.6.1). Por lo que se debe seguir lo siguiente:

- 1) Separar 1ml de medio inducido cerca de la flama.
- 2) Centrifugar a 4000rpm durante 20 min (micro-centrífuga).
- 3) Eliminar el sobrenadante.
- 4) Re suspender el sedimento en 500µl de tampón de muestra.
- 5) Sonicar 3 veces con pausas de 1min.
- 6) Centrifugar a 4000rpm durante 20 min.
- 7) Transferir sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio. Re suspender pellet en 50µl de tampón de muestra.
- 8) Guardar a -20°C hasta realizar el gel de electroforesis.

3.4.6.Tratamiento del sedimento bacteriano.

La proteína tau es producida por la bacteria de manera intracelular, por lo que es necesario procesar el sedimento bacteriano recolectado de la centrifugación del medio de cultivo, con el fin de obtener un extracto enriquecido de la proteína expresada.

El protocolo de lisis bacteriana es importante para la obtención de la proteína Tau y de los receptores muscarínicos (Fig.29). Es importante mantener siempre en hielo las muestras que se procesen debido a que la técnica empleada para romper la membrana, conocida como sonicación, sobrecalienta las muestras provocando la desnaturalización de la proteína de interés. Esta técnica consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular, donde la agitación producida destruye la membrana celular.

Composición Buffer MES: 50mM MES; pH=6.8, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.1mM PMSF.

Una vez finalizado el protocolo, es importante etiquetar las muestras debidamente, en nuestro caso se nombraron:

SB IND: Sobrenadante Inducido.

P.IND: *Pellet* inducido.

SB NoIND: Sobrenadante No Inducido.

P.NoIND: *Pellet* No Inducido.

Los pellets y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta realizar los geles de electroforesis pertinentes (ver apartado 4.6.1).

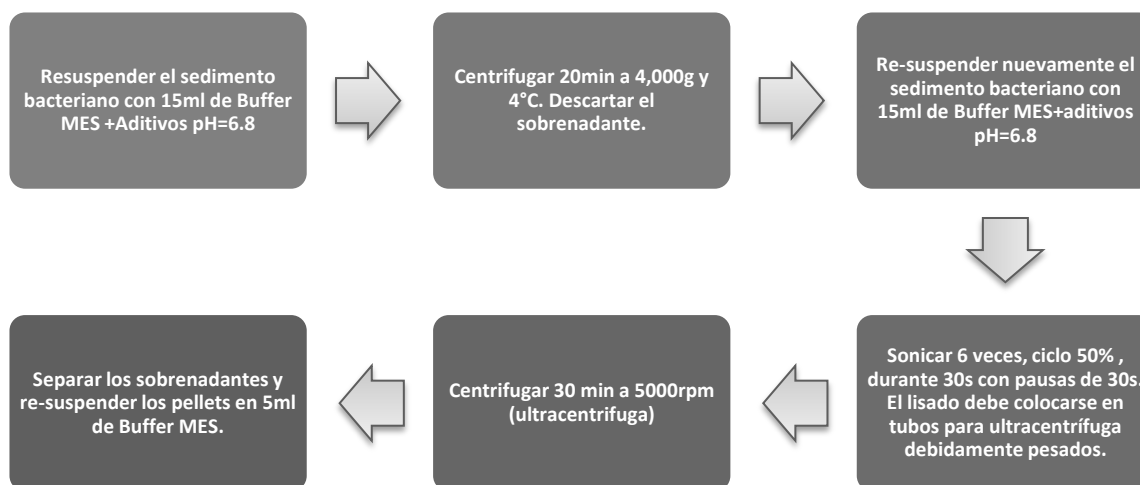


Figura 29. Protocolo de lisado bacteriano.

3.5. Purificación de la proteína tau.

Una vez realizado el tratamiento del sedimento bacteriano descrito anteriormente, es necesario separar la proteína tau de otras proteínas propias de la bacteria que contiene el sedimento. Para poder alcanzar el grado de pureza necesario para futuros ensayos se emplean las cromatografías que se definen a continuación.

3.5.1. Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía es una de las técnicas de purificación más utilizadas para la caracterización de mezclas complejas. Este método se basa en el principio de retención selectiva y su objetivo es la separación de distintos componentes de una mezcla. Los componentes se encuentran disueltos en una fase móvil y se desplazan con distintas velocidades a través de una fase estacionaria. El grado en que una molécula absorbe o interactúa con la fase estacionaria determinará que tan rápido será trasladada por la fase móvil. La separación de mezclas de proteínas por métodos cromatográficos se ha convertido en una de las más efectivas y ampliamente utilizadas en el mundo para purificar proteínas específicas.

Las proteínas tienen grupos funcionales cargados positiva o negativamente. El punto isoeléctrico (pI), es decir el pH donde la carga neta es 0, depende de la proporción de aminoácidos existentes en su estructura. Mediante esta técnica se logra separar las proteínas de acuerdo a su carga neta, la cual dependerá de la fase móvil empleada. Así, ajustando el pH o la concentración de iones de la fase móvil se logrará la separación (Fig.30).

La fase estacionaria se conoce como resina de intercambio y presenta en su superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta. Dependiendo la carga de la fase estacionaria, este tipo de cromatografía se clasifica en dos: cromatografía de intercambio catiónico y de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente.

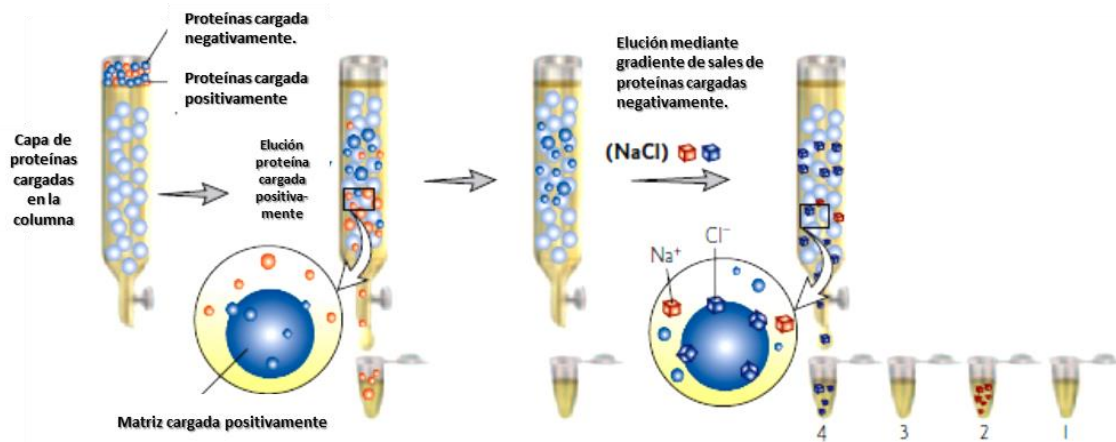


Figura 30 Esquema de una clásica cromatografía de intercambio iónico. Las cargas de las proteínas se emplean para la purificación (Allison, 2007).

En nuestro caso, se empleará una columna de intercambio catiónico. Se trabajará con una columna *SP y CM Sepharose Fast Flow* de GE Healthcare. La matriz se encuentra empaquetada en polipropileno, es bio compatible y no interacciona con las biomoléculas. Además se empleará el equipo de cromatografía *ÄKTA Purifier 10* de GE Healthcare.

Durante este proceso se empleará también una solución tampón o Buffer A para el equilibrio de la columna con las condiciones en las que se encuentra la proteína a purificar (50mM MES; 50mM NaCl, pH 6.8) y un Buffer B de elución con una concentración mayor de sales (50mM MES; 1M NaCl, pH 6.8).

La cromatografía de intercambio catiónico está dividida en tres fases:

- Equilibrado de la fase estacionaria. Es esta etapa se realizará un lavado de la columna con la solución Buffer a las condiciones salinas y de pH requeridas para el experimento.
- Aplicación de la muestra y lavado: La muestra deberá encontrarse en el mismo Buffer empleado para el equilibrio de la columna. Es necesario centrifugar la muestra y filtrarla antes de introducirla en el equipo. Así como también evitar

introducir burbujas al inyectar la muestra, ya que el equipo es demasiado sensible a cambios bruscos de presión.

- Elución de las proteínas unida a la matriz: Mediante un incremento gradual del gradiente de concentración de NaCl, comenzarán a eluir las proteínas menos cargadas positivamente y las de mayor carga, más adheridas, eluirán después.

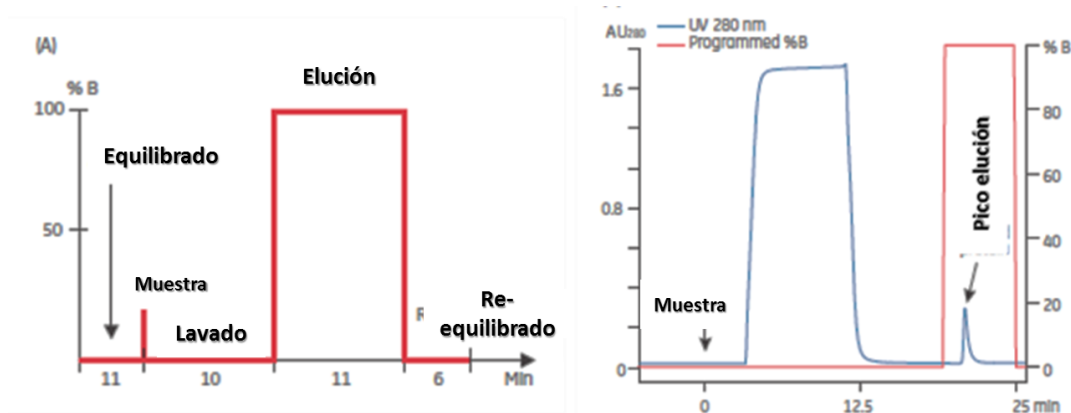


Figura 31. Cromatograma general de una purificación mediante elución por gradiente de sales. (Amersham Pharmacia Biotech, 2011)

Para el proceso de equilibrado, deberán pasarse al menos 5 volúmenes del Buffer A por volumen de columna.

La aplicación de las concentraciones crecientes en la columna se hará de manera gradual (gradiente continuo) (Fig.31) o bien de forma escalonada o en etapas (gradiente isocrático). El gradiente continuo es especialmente eficaz para separar solutos que tienden a salir de la columna en un intervalo de concentraciones cercano. Los componentes de la muestra separados se detectan en el efluente mediante su análisis en continuo. Por ejemplo: midiendo absorbancia a 280 nm para proteínas o bien midiendo la absorbancia a 260 nm para ácidos nucleicos. También es posible detectarlos mediante el análisis de las fracciones recolectadas con cualquier tipo de análisis (absorbancia, electroforesis, radiactividad, ensayo enzimático).

El volumen de la columna eluido será recolectado mediante un colector de fracciones automático programado para recoger un número y un volumen determinado en cada fracción (0.5ml). Para conocer donde se encuentran las fracciones que contienen la proteína eluida, deberá observarse la absorbancia a 220nm.

Al ser la primera ocasión que esta proteína es purificada en el GBMI y mediante el sistema ÄKTA Purifier 10, deberá observarse bien los picos de elución así como también el gradiente al cual

se tiene reportado su elución (Csokova, et al., 2004). Una vez que se tengan las fracciones detectadas, se deberán analizar electroforéticamente.

3.6. Análisis de expresión de receptores muscarínicos y de la proteína tau mediante métodos electroforéticos.

Los métodos electroforéticos en la actualidad son ampliamente conocidos y utilizados dentro la investigación en biología molecular. Como se mencionó en el apartado 4.4.3 esta técnica se basa en la migración diferencial de moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa, por lo tanto, cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Los elementos necesarios para llevar a cabo la separación electroforética son principalmente: una fuente de alimentación que proporcione un campo eléctrico mediante dos electrodos (un cátodo y un ánodo), un soporte electroforético y una solución tampón o Buffer de electroforesis (Fig.32).

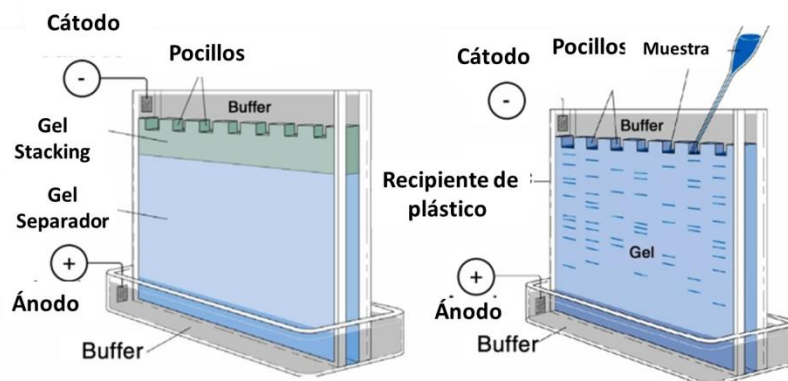


Figura 32. Esquema de un montaje para geles de poliacrilamida.

En esta parte del trabajo se emplearán dos tipos de métodos electroforéticos para comprobar la expresión de los receptores muscarínicos a partir de cultivos eucariotas así como también la expresión de la proteína tau en cultivos procariotas.

El soporte empleado en los geles de una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, "PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"), se prepara a partir de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) con N, N'-metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) como agente entrecruzante. El primer compuesto funciona como un monómero, es decir, como unidad básica para la formación de largas cadenas lineales (poliacrilamida); el segundo tiene la función de controlar el entramado de las cadenas de acrilamida mediante su unión de forma covalente. Cuando la solución de acrilamida polimeriza, adquiere la forma del recipiente, por lo tanto es necesario un molde. La reacción y velocidad de polimerización está catalizada generalmente por la concentración de APS (per-sulfato de amonio) y TEMED (N, N, N, N'-tetrametilendiamina) empleado. El porcentaje total

de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. De esta manera, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

3.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (*SDS-PAGE*)

Los geles de poliacrilamida *SDS-PAGE* se realizarán siguiendo la metodología descrita por Laemmli en 1970 y modificada posteriormente por Thomas y Kornberg ocho años más tarde. Este es un tipo de electroforesis desnaturizante donde las muestras se desnaturalizan a consecuencia del calor, de la presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS), el cual recubre a la proteína con cargas negativas, del uso de beta-mercaptoetanol o el DTT (*"dithiothreitol"*), que destruyen los puentes disulfuro separando las cadenas polipeptídicas aisladas. La cantidad de SDS que se une a las proteínas es proporcional a su masa, es decir, el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Es importante mencionar que la unión SDS-proteína es crítica para conseguir una buena migración electroforética (Fig.33).



Figura 33. Esquema de una electroforesis en gel de poliacrilamida en proceso.

Este sistema proporciona un alto nivel de resolución debido a que es un sistema electroforético discontinuo formado por dos tipos de geles de diferente porosidad y pH:

- Gel acumulador o concentrador (*stacking*). Es un gel que contiene una baja concentración de acrilamida, por lo tanto, no tiene tanta resistencia al paso de moléculas.
- Gel separador (*resolving*). Este gel se encuentra en la parte baja del sistema y contiene una concentración más alta de acrilamida en comparación con el *stacking*. En esta fase es donde se logra la separación de moléculas con distinta masa molecular.

La preparación y montaje de cada gel empleado en este trabajo fue el mismo día en que se realizaría la electroforesis (Tabla 12), y para llevar a cabo esta técnica se siguieron las indicaciones del protocolo para geles *SDS-PAGE* (Fig.34). Es necesaria también la preparación de una solución

amortiguadora para llevar a cabo la electroforesis, llamada Buffer TGS1X (Anexo vi) la cual garantizará la solubilidad de la muestra durante el proceso.

Las muestras que se cargaran en los pocillos del gel, se preparan añadiéndoles una solución tampón llamada *Loading Buffer*4X (Anexo vii). Por lo tanto, si el volumen total a cargar será de 24 μ l, el volumen de la muestra deberá ser de 18 μ l + 6 μ l de L.Buffer4X. Es importante el uso de un marcador de peso molecular ($V_T=5\mu$ l), en nuestro caso se emplea el de la casa comercial Sigma “*Molecular Weight Marker SDS6H2*”. Finalizada la electroforesis los geles serán teñidos y desteñidos con soluciones preparadas para el uso común del laboratorio (Anexo vi, Tabla.24-25).

Tabla 12. Composición para 2 geles SDS-PAGE

Gel Separador (<i>Resolving gel</i>)			
REACTIVOS	STOCK	CONDICIONES GEL	VOLUMEN
Agua destilada	-	-	1250 μ l
Tris-HCl	1.5M pH=8.8	0.75M	5000 μ l
Acrilamida-Bisacrilamida	37.5% - 0.8%	12% -5%	3200 μ l
SDS	10%	0.1%	100 μ l
APS	10%	0.1%	100 μ l
TEMED	10%	0.5%	50 μ l
Una vez que se termina de preparar el gel separador, se añade isopropanol para agilizar la polimerización de la parte superior del gel. Se espera de 15-20min.			
Gel concentrador (<i>Stacking gel</i>)			
REACTIVOS	STOCK	CONDICIONES GEL	VOLUMEN
Agua destilada	-	-	2900 μ l
Tris-HCl	0.5M pH=6.8	0.125M	1250 μ l
Acrilamida-Bisacrilamida	37.5% - 0.8%	5% - 0.13%	670 μ l
SDS	10%	0.1%	50 μ l
APS	10%	0.1%	50 μ l
TEMED	10%	0.5%	50 μ l
Inmediatamente al término de la preparación del gel concentrador deberá colocarse el peine formador de pocillos.			

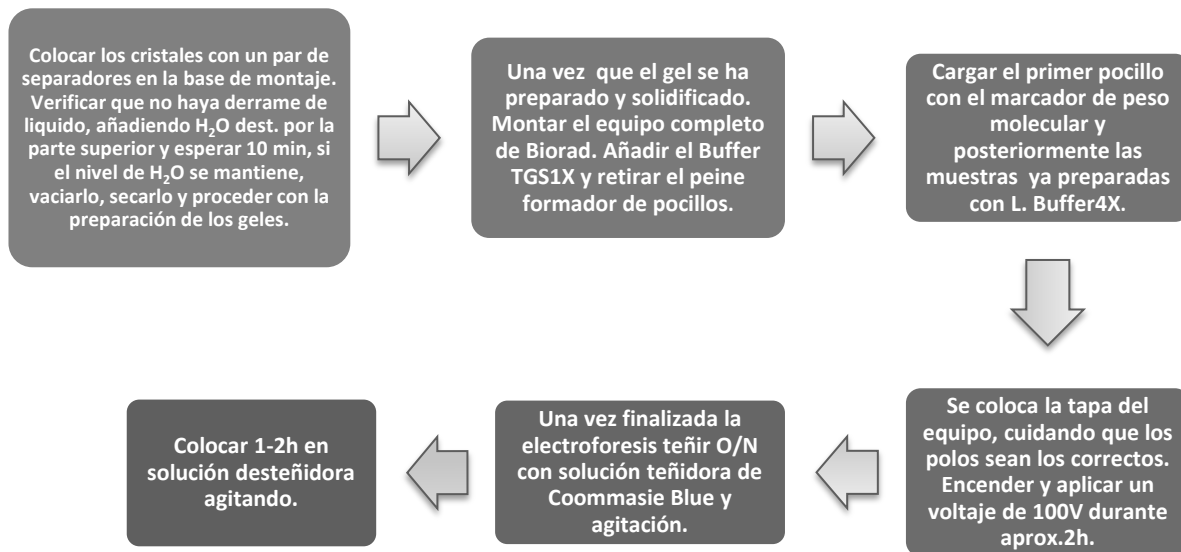


Figura 34. Protocolo para geles SDS-PAGE.

Una vez finalizado el proceso y obtenido el gel *SDS-PAGE*, es posible conservarlo. Para ello se procede a secarlo de la siguiente forma:

Con sumo cuidado se emplearan dos láminas de celofán húmedas, colocando 1 sobre una placa de vidrio y un bastidor rectangular, se coloca el gel a secar por el centro y se cubre con la segunda lamina de celofán y un segundo bastidor. Se sujeta con pinzas cuidando de no dejar burbujas en el centro. Dejarlo secar de 2 a 5 días.

3.6.2. Western blot.

El *western blot* o inmunoblot, es una técnica comúnmente empleada para la detección de proteínas específicas dentro de una mezcla compleja de proteínas. Primero es necesario separar las muestras mediante una electroforesis en gel *SDS-PAGE*. Una vez que han sido separadas, deberán ser transferidas a una membrana absorbente (usualmente se emplean membranas de nitrocelulosa, de PVD (*"Polyvinylpyrrolidone"*), de PVDF (*"polyvinilydene difluoride"*) o de nylon) (Fig.35).

Estas membranas serán incubadas con anticuerpos específicos para la proteína de interés, los cuales se unirán a la banda de la proteína que se encuentra inmovilizada en la membrana. Posteriormente la proteína se incubará con un anticuerpo secundario, éste reconocerá de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Este tipo de anticuerpos suelen estar marcados para ser detectables (unión a biotina, a una enzima *reporter* como la fosfatasa alcalina o

la peroxidasa del rábano (HRP), etc.). Una vez que se ha “marcado” la membrana se deberá proceder a la detección de la proteína de interés.

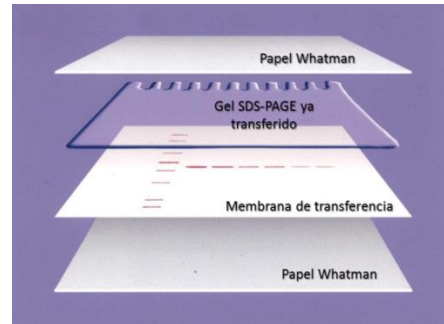


Figura 35. Esquema del montaje para transferencia de proteínas mediante *Western blot*.

Existen diferentes métodos para la detección de la proteína en la membrana transferida, en nuestro caso se realizará mediante una detección quimioluminiscente (Fig.36), la cual requiere la incubación de la membrana con un sustrato, este emitirá luminiscencia al ser expuesto al *reporter* que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida será detectada por una película fotográfica, recientemente se emplean cámaras CCD, que toman una imagen digital del *Western blot*.

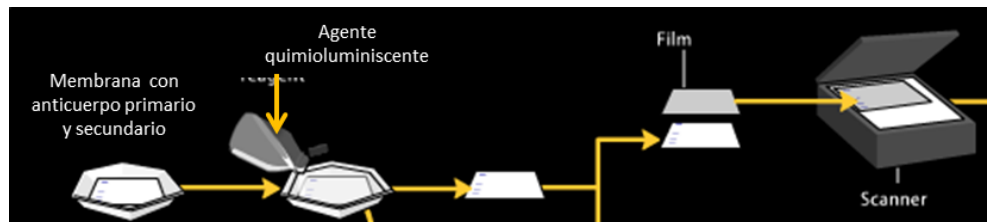


Figura 36. Esquema de revelado de una membrana de *Western blot*.

El protocolo de *Western blot* (Fig.37) para la detección de la proteína tau y de los receptores muscarínicos M_1 y M_3 , requiere de anticuerpos y soluciones debidamente preparados (Tablas.13, 14, 15), es importante que las soluciones con los anticuerpos sean almacenadas a 4°C durante su empleo, ya que estas serán reutilizadas durante 1-2 meses a partir de su preparación.

Solución bloqueo (“*Blotting Buffer*”): 50ml Buffer TBS1X + 5% leche en polvo (2.5g).

Anticuerpo primario proteína TAU: 10ml Buffer TBS1X + 1µl Anti-Tau 5 MBL.

Anticuerpo secundario proteína TAU*: 10ml Buffer TBS1X + 2µl goat anti-mouse IgG-HRP

Anticuerpo primario M_1 *: 10ml Buffer TBS1X + 1µl mAChR M_1 -Rabbit polyclonal IgG.

Anticuerpo primario M_3 *: 10ml Buffer TBS1X + 1µl mAChR M_3 -Rabbit polyclonal IgG.

Anticuerpo secundario M₁ y M₃*: 10ml Buffer TBS1X + 2 µl goat anti-rabbit IgG-HRP.

*todos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology.

Tabla 13. Composición de Buffer Transferencia 1X.

BUFFER TRANSFERENCIA 1X	
Tris base	5.82g
Glicina	2.93g
Metanol	200ml
H ₂ O dest. a 1L	

Tabla 14. Composición del Buffer TBS10X (“Tris-buffered saline”).

TBS 10X (1L)	
Tris	12.1g
NaCl	87.66g
HCl	4ml
pH	8
H ₂ O dest. a 1L	

Tabla 15. Composición del Buffer TTBS1X (“Tween Tris buffered saline”).

TTBS 1X (1L)	
TBS 10X	100ml
Tween 20	1ml
Ajustar con 900ml H ₂ O destilada.	

La única diferencia al cargar las muestras en el gel *SDS-PAGE* y recomendación consiste en emplear un marcador de peso molecular pre-teñido para monitorizar el avance de la electroforesis y la eficacia de la transferencia de las proteínas a la membrana, en nuestro caso se emplea de la casa comercial Sigma el “*Prestained Molecular Weight Marker SDS7B2*”.

El kit de detección por quimioluminiscencia empleado es de la casa comercial ThermoScientific “*SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate*” y dependiendo el tamaño de la membrana a revelar se emplearon las siguientes cantidades:

Peroxide Solution: 250-400µl

Luminol Enhancer Solution: 250-400µl

Además se utilizaron soluciones típicas de revelado fotográfico, ya que la luminiscencia desprendida por la membrana se captó con la película fotográfica “Curi X/ RP2 Plus XRay Film” de AGFA.

Solución Reveladora (*Developer*): 7.5ml + 25ml H₂O dest.

Solución Fijadora (*Fixer*): 4.5ml + 25ml H₂O dest.

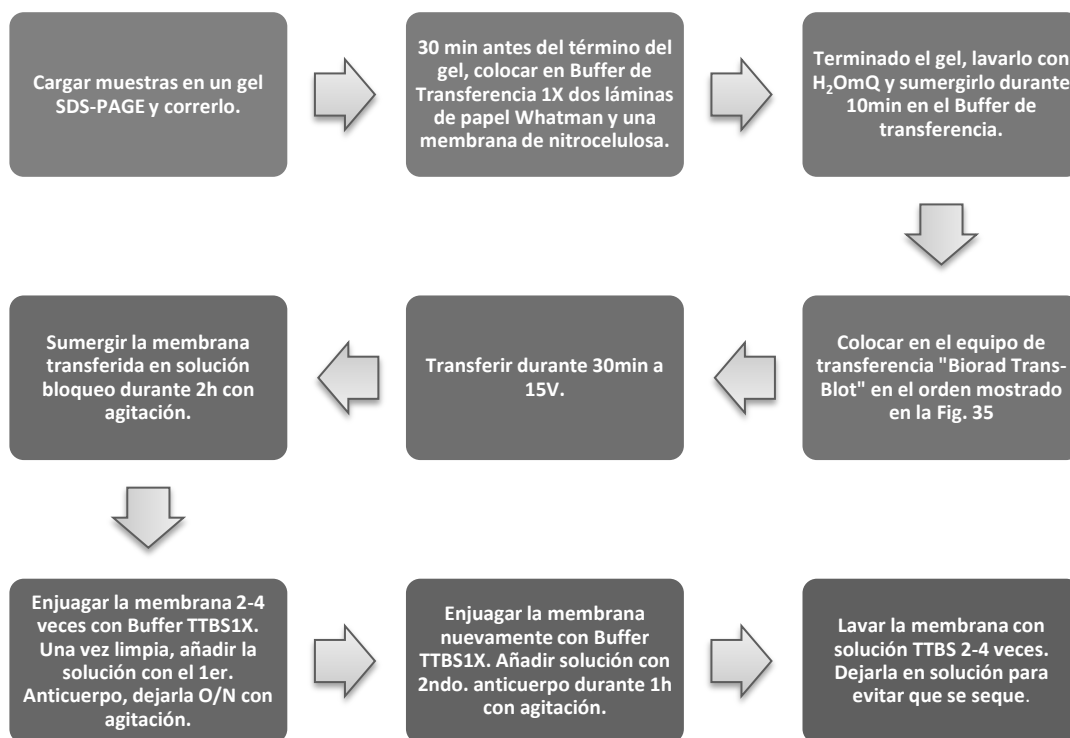


Figura 37. Protocolo para *Western blot*.

El revelado se llevará a cabo con las soluciones mencionadas anteriormente, dentro de un cuarto de revelado (oscuro). Se añadirán las soluciones del kit de revelado sobre la membrana transferida e incubada con los anticuerpos primarios y secundarios. Se dejará actuar unos segundos, una vez que sea posible detectar emisión de luz, se colocará una lámina de parafilm transparente y sobre ella el film fotográfico. Presionar suavemente durante 20s-40s. Introducir el film fotográfico en la solución reveladora hasta la aparición de bandas, inmediatamente trasladar el film al agua, por último dejar el film en la solución fijadora por 1 min. Una vez fuera del cuarto de revelado, limpiar el film revelado con H₂O dest. Dejar secar.

3.7. Determinación de la concentración de la proteína tau purificada: método de Lowry.

Este método fue descrito por primera vez por Lowry y colaboradores en 1951, está basado en la formación de un complejo proteína-cobre bajo condiciones alcalinas que subsecuentemente reducirá el agente de Fenol-Folin, a un pH 10, con un proceso de colorimetría fácilmente cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro a una $\lambda=650\text{nm}$ (Ellis Bell & T.Bell, 1988). La asociación de dos reacciones complementarias explica este proceso:

- 1) Reacción del Biuret: característica de grupos amino peptídicos, con los que el Cu(II) en medio alcalino forma enlaces de coordinación, originando complejos de color violeta.
- 2) Reactivo de Folin-Ciocalteu: característica de grupos -OH reductores que, junto con los complejos cuproproteicos de la reacción del Biuret, reducen el reactivo de Folin, el cual vira a color azul oscuro.

Con el método de Lowry (Fig.38), la concentración de una muestra desconocida de una proteína puede ser determinada mediante la comparación con una curva estándar de soluciones, en nuestro caso se empleará BSA, a concentraciones conocidas. Será necesario preparar las soluciones de reacción poco antes de hacer las mediciones de la absorbancia, ya que algunos de los reactivos empleados pierden su función pasado un par de horas. El volumen a preparar para la solución A y B será de 10ml.

Solución A: NaOH (0.1M) + 0.2g Na₂CO₃ + 9.8ml H₂O mQ.

Solución B: 0.1g Na₂C₂O₄ + 50mg CuSO₄ + 10ml H₂O mQ.

Solución C: 500μl Folin-Ciocalteu Reagent + 500μl H₂O mQ.

Tubo Control: 20μl Buffer

Tubo muestra a medir: 20μl elución purificada.

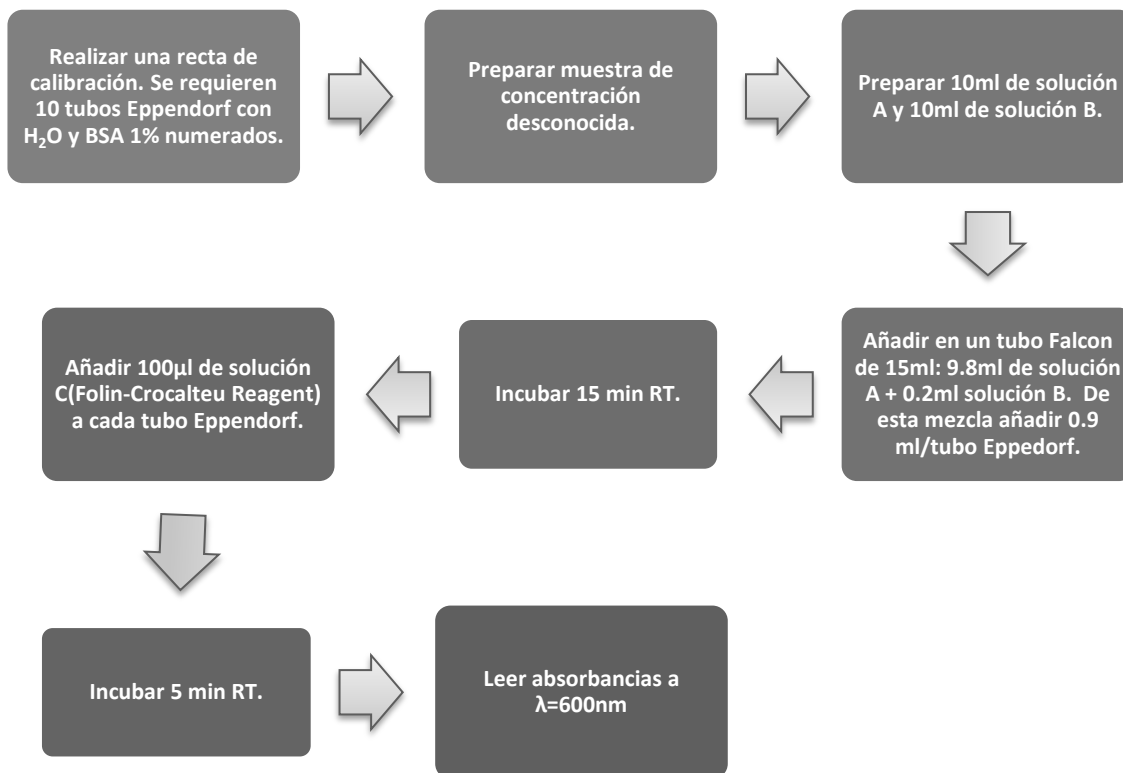


Figura 38. Método de Lowry para medir la concentración de una proteína purificada.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Estimación de la pureza y concentración del ADNc mediante el protocolo de Maxiprep.

4.1.1. Transformación de células competentes DH5- α para la obtención de ADNc.

La concentración y la pureza de los ADNc de la proteína Tau (vector PRKT42) y los receptores muscarínicos M₁ y M₃, obtenidos a partir de las células DH5- α transformadas mediante el protocolo detallado en el apartado 4.2, se determinó empleando la Ec.2 y el cociente entre las absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀ respectivamente. En la Fig. 39 se muestra el crecimiento bacteriano de las células DH5- α transformadas de donde se tomaron las colonias para preparar el maxi cultivo necesario para realizar las Maxiprep. Estas placas pueden mantenerse estables durante 2-3 meses almacenadas a 4°C, una vez transcurrido este tiempo será necesario realizar nuevamente una transformación y obtener una placa nueva.

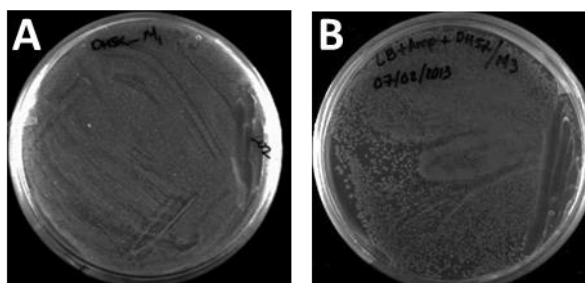


Figura 39. Transformación de células competentes con ADNc del receptor M₁(A) y M₃ (B).

Durante el transcurso del proyecto fueron necesarias varias Maxiprep y todas fueron analizadas mediante estas ecuaciones para garantizar una alta concentración y pureza. En la Fig.40 se pueden observar los espectros de absorción del ADNc del gen tau (PRKT42) y del receptor muscarínico M₁.

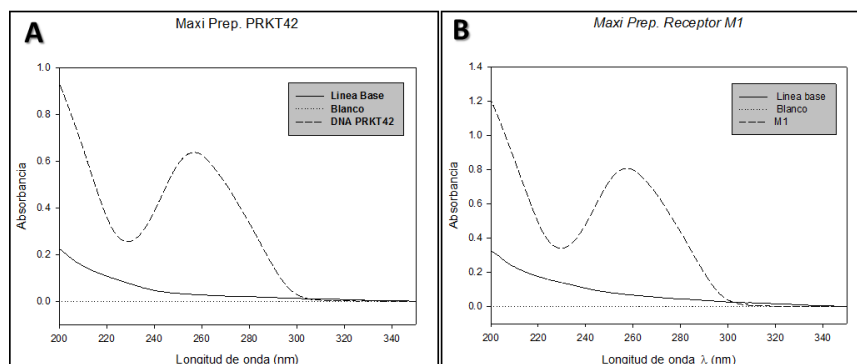


Figura 40 Espectros de absorción UV ($\lambda=230-340\text{nm}$) correspondientes a los ADNc purificados por Maxiprep. PRKT42 (A) y receptor M₁ (B).

Como pueden observarse en los datos de la Tabla 16, las concentraciones y los grados de pureza cumplen las especificaciones necesarias.

Tabla 16. Cálculo de las concentraciones y purezas obtenidas mediante el procedimiento de Maxiprep.

ADNc	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (μg/μl)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
M ₁	0.80702	0.44283	4.035	1.82242
M ₃	0.53264	0.27567	2.663	1.93217
PRKT42	0.62961	0.33811	3.148	1.86210

4.2. Transfección y expresión de los receptores muscarínicos M₁ y M₃ en diferentes líneas celulares.

4.2.1. Detección de la expresión mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot.

Una vez que se procesaron las muestras transfectadas con los receptores M₁ y M₃ con 1%DM + 1ml PBS1X frío/placa (ver apartado 4.3.2), para extraer del interior de la célula los mismos, se procedió a analizarlas electroforéticamente para detectar la expresión de estos en las líneas celulares HEK 293T y COS-1.

Se procedió con la preparación de un gel SDS-PAGE, cargando las muestras procedentes de 8 placas transfectadas con el ADNc del receptor M₃ y M₁, respectivamente, por duplicado a diferentes volúmenes de carga (25μl, 20μl y 15μl) para teñir parte del gel con solución Coomassie Blue y la otra parte transferirla a una membrana de nitrocelulosa para su detección mediante Western blot (Fig.41).

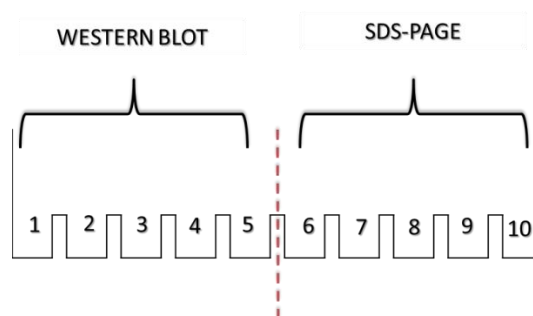


Figura 41. Esquema de la distribución de muestras en gel SDS-PAGE para tinción con solución Coomassie Blue y Western blot.

Primero se procesaron electroforéticamente las células tipo HEK 293T transfectadas con el ADNc del receptor M₃.

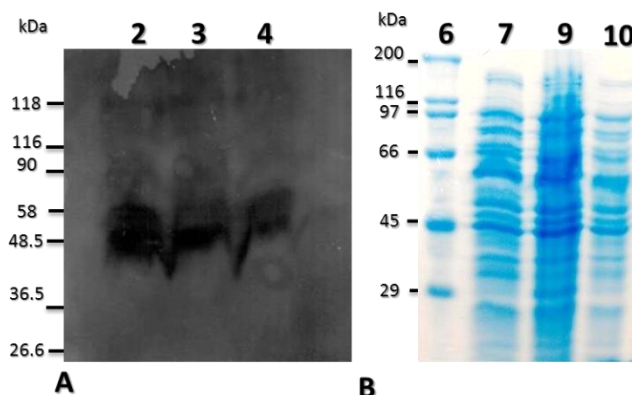


Figura 42. Expresión del receptor M_3 en células HEK 293T. (A) *Western blot*: carriles, (2-4) vol. muestra cargada por carril: 24 μ l, 20 μ l, 15 μ l, respectivamente; (B) *SDS-PAGE*: carril (6), marcador de peso molecular, (7-10) vol. muestra cargada por línea: 24 μ l, 20 μ l, 15 μ l, respectivamente.

Como se puede observar en la Fig.42, al tener la presencia de múltiples bandas en el gel teñido con la solución de Coomassie Blue (B), se dificulta apreciar claramente la presencia de una banda específica para el receptor M_3 a aproximadamente 60 kDa. Es por esto que se procedió al análisis mediante *Western blot*, y de esta forma fue posible observar las bandas inmunoreactivas correspondientes al receptor M_3 .

Se continuó con el procesamiento electroforético de las células tipo HEK 293T transfectadas con el ADNc del receptor M_1 .

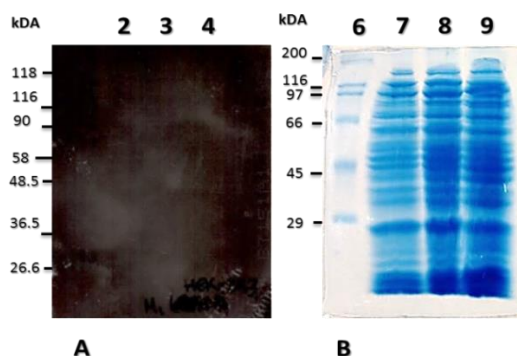


Figura 43. Expresión del receptor M_1 en células HEK 293T. (A) *Western blot*: carriles (2-4) vol. muestra cargada por línea: 24 μ l, 20 μ l, 15 μ l, respectivamente; (B) *SDS-PAGE*: carril (6) marcador de peso molecular, (7-10) vol. muestra cargada por línea: 24 μ l, 20 μ l, 15 μ l, respectivamente.

Como se aprecia en la Fig.43, en este tipo de línea celular no se logra obtener una expresión del receptor M_1 .

Teniendo el resultado de una expresión favorable del receptor M_3 en este tipo de células, las cuales presentan varias ventajas en cuanto a su crecimiento, mantenimiento y transfección, se

decidió que se continuaría buscando únicamente la expresión del receptor M_1 en la línea celular COS-1. En este caso solo se cargaron dos volúmenes diferentes de muestra, 15 μ l y 24 μ l por duplicado, para realizar nuevamente un gel teñido con solución Coomassie Blue y otro para *Western blot*.

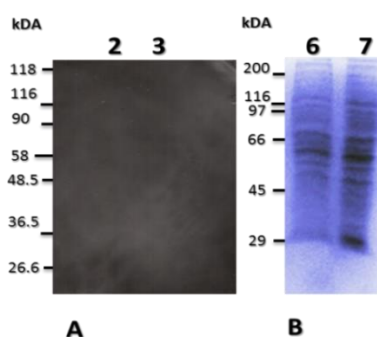


Figura 44. Expresión del receptor M_1 en células COS-1. (A) *Western blot*: carriles (2-3) vol.muestra:15 μ l, 24 μ l, respectivamente. (B) *SDS-PAGE*: carriles (6-7) vol.muestra:15 μ l, 24 μ l, respectivamente.

Como se observa en la Fig.44, tampoco es posible detectar la presencia del receptor M_1 expresado en este tipo de células, Este protocolo se repitió por triplicado con muestras provenientes de stocks transfectados en diferentes días, obteniéndose siempre el mismo resultado.

4.3. Obtención y purificación del gen de la proteína tau y el plásmido pET-17b.

Como se mencionó anteriormente, el vector de expresión PRKT42 que contiene el gen de la proteína tau, fue donado por el Dr. Jesús Ávila de la UAM, sin embargo al comienzo de este trabajo se contaba con poca información del mismo. Por lo que se procedió primero a transformarlo en células competentes DH5- α para detectar el tipo de marcador de resistencia, ampicilina o kanamicina, que contenía mediante el protocolo de transformación descrito en el apartado 4.2.

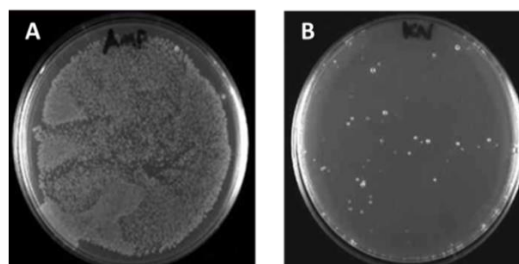


Figura 45. Análisis del marcador de resistencia del vector de expresión PRKT42 en células competentes DH5- α . (A) Placa con LB agar + Ampicilina. (B) Placa con LB agar + Kanamicina.

La Fig.45, muestra el crecimiento bacteriano después de una transformación en células competentes DH5- α , como se puede observar el crecimiento se presenta únicamente en la placa que contiene ampicilina (A) y no se observa nada en la placa con kanamicina (B). De esta forma sabemos que el vector posee un marcador de resistencia a ampicilina (amp^R).

Se procede por lo tanto a la transformación del plásmido PRKT42 en células competentes BL21 (DE3) para obtener la expresión de la proteína Tau en un cultivo a pequeña escala (ver apartado 4.4.5). Habiendo procesado el cultivo inducido y no inducido, se procede a re-suspender los *pellets* en 500 μl de solución amortiguadora. Una vez procesadas las muestras, se obtienen 4 tubos Eppendorf, dos son muestras inducidas y dos son muestras no inducidas. Al realizar el gel SDS-PAGE, se cargaran 24 μl de cada muestra, duplicándolo para realizar también un Western blot.

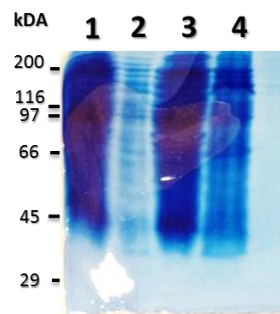


Figura 46. Análisis electroforético en gel SDS-PAGE del proceso de expresión de la proteína tau (PRKT42) en células BL21 (DE3). Carriles: (1) Sobrenadante células no inducidas, (2) *Pellet* células no inducidas, (3) Sobrenadante células inducidas, (4) *Pellet* células inducidas. En todas las muestras el volumen de carga es de 24 μl (18 μl + 6 μl *Loading Buffer*).

En la Fig.46 se observan bandas difíciles de analizar debido a la saturación de la solución de Coomassie así como también a la cantidad de células de origen bacteriano presentes en la muestra analizada, sin embargo al revelar el western blot, no se detectó mediante la incubación de anticuerpos específicos para tau, la expresión de la proteína.

Una vez analizados los resultados, siendo estos negativos, se procedió a solicitar mayor información del plásmido donado por el grupo del Dr. Jesús Ávila, el cual posteriormente nos contactó para indicarnos que efectivamente el plásmido donado había sido modificado para expresar únicamente en células de tipo neuronal (SH-SY5Y), por lo que se procedió a la digestión enzimática del plásmido para poder obtener el gen codificante de la proteína tau e introducirlo en un plásmido, pET-17b (Novagen, USA), adecuado para su expresión y con resultados positivos reportados (Csokova, et al., 2004).

4.3.1. Digestión enzimática del vector PRKT42 para la obtención del gen de la proteína tau.

La ubicación de los sitios de corte determinará el tamaño de los fragmentos que se producirán. Las moléculas de ADNc grandes viajan despacio a través del gel, mientras que las

moléculas pequeñas viajarán más aprisa. El gel está orientado de modo que las bandas correspondientes a una migración más lenta (moléculas de mayor tamaño) se encuentren en la parte superior y las moléculas más rápidas (moléculas pequeñas) se encuentren en la parte inferior.

Basándose en el mapa recibido del vector PRKT42 (Anexo i) y teniendo la información de que el gen que codifica a la proteína Tau se encuentra entre las dianas de restricción EcoRI y NdeI, se procede con el protocolo de digestión enzimática detallado en el apartado 4.4.3, preparando una digestión de un $V_T = 10\mu\text{l}$. Como resultado de una digestión enzimática simple se espera observar una sola banda lineal. También podremos conocer el peso aproximado del plásmido PRKT42.

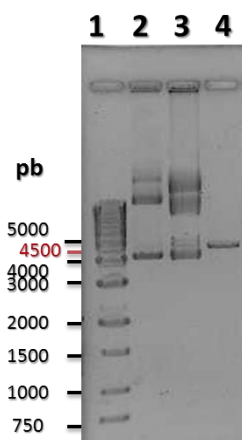


Figura 47. Análisis electroforético en gel de agarosa de la digestión enzimática del plásmido PRKT42. Carriles (1) marcador de peso molecular, (2) muestra PRKT42 no digerida, (3) muestra PRKT42 digerida con EcoRI, (4) muestra PRKT42 digerida con NdeI. En todas las muestras el volumen de carga es de $5\mu\text{l} + 1\mu\text{l}$ Loading Buffer6X.

Como se puede observar en la Fig. 47, la muestra de ADNc digerida con la enzima EcoRI, carril 3, resultó negativa, mientras que la digestión con la enzima NdeI, carril 4, nos proporcionó una banda lineal, lo cual significa que se ha digerido correctamente. El peso aproximado del plásmido PRKT42 es de 4,500bp.

A partir de aquí se decide que debe enviarse a secuenciar una muestra del ADNc de la proteína tau (PRKT42), para conocer realmente las dianas de restricción que se encuentran en los extremos del gen deseado, y continuar con el trabajo. Una vez que se diseñaron los *primers* y se secuenció, se observó que efectivamente las bases que reconocen a la enzima EcoRI se encontraban mutadas de forma silenciosa en un codón (ver apartado 4.4.1). Se analiza por lo tanto la secuencia y los aminoácidos codificados por ese triplete y se lleva a cabo la mutagénesis dirigida por PCR para cambiar el nucleótido correspondiente.

Se obtiene como producto de la mutagénesis dirigida, una placa con crecimiento bacteriano de la cual se seleccionarán dos colonias (A y B) para preparar dos mini cultivos que se procesaron mediante el protocolo de Miniprep (ver apartado 4.2). Para comprobar que la mutación del sitio de restricción para EcoRI se había realizado con éxito, se prepararon las muestras A y B con las condiciones necesarias para una reacción de digestión enzimática con un $V_T=10\mu\text{l}$ (Tabla.17). Además se preparó también una muestra con un $V_T= 20\mu\text{l}$ del plásmido pET-17b para digerirlo con la enzima EcoRI (Tabla.17).

Tabla 17. Condiciones reacción enzimática con EcoRI.

A-PRKT42	B-PRKT42	pET-17b
2 μl H ₂ OmQ.	2 μl H ₂ OmQ.	3 μl H ₂ OmQ.
6 μl ADN _A	6 μl ADN _B	15 μl ADN _{pET-17b}
1 μl Buffer SH	1 μl Buffer SH	1 μl Buffer SH
1 μl EcoRI	1 μl EcoRI	1 μl EcoRI

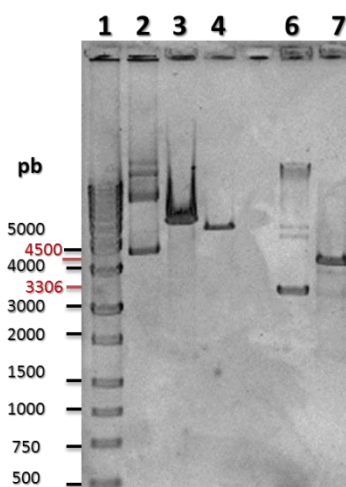


Figura 48. Análisis electroforético en gel de agarosa de la digestión enzimática con EcoRI del plásmido PRKT42 mutado y del plásmido pET-17b. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) muestra PRKT42 no digerida, (3) muestra A-PRKT42 digerida, (4) muestra B-PRKT42 digerida, (6) muestra plásmido pET-17b no digerido, (7) muestra plásmido pET-17b digerido. En todas las muestras el volumen de carga es de 5 μl + 1 μl Loading Buffer6X.

En la Fig.48 es posible apreciar que la mutación se ha introducido en el vector, ya que se observan en el carril 2 y 3, dos bandas claras, sin embargo es necesario secuenciar las muestras para comprobar que la mutación es correcta, mientras la secuenciación es realizada por el servicio de Genómica Bioinformática de la UAB, se procede a realizar una verificación rápida mediante una segunda digestión enzimática con BamHI para obtener el gen de la proteína tau (Tabla.18), si la introducción de la mutación se ha realizado con éxito deberemos observar dos bandas en el gel de agarosa, una de ellas correspondiente al tamaño del gen: 1386pb, el cual será nuestro inserto.

En esta figura también se observa la digestión realizada al plásmido pET-17b, de donde se procede a purificar mediante el protocolo detallado en el apartado 4.4.6 a partir de una banda de gel de agarosa. Una vez purificado el vector se procederá a realizar una segunda digestión con la enzima BamHI para así obtener el esqueleto del plásmido donde se insertará el gen de la proteína tau (Tabla.18).

Tabla 18. Condiciones reacción enzimática con BamHI.

A-PRKT42	B-PRKT42	pET-17b_{purif.}
2 µl H ₂ O _{mQ.}	2 µl H ₂ O _{mQ.}	2 µl H ₂ O _{mQ.}
6 µl ADN _A	6 µl ADN _B	6 µl ADN _{pET-17b}
1 µl Buffer SB	1 µl Buffer SB	1 µl Buffer SB
1µl BamHI	1µl BamHI	1µl EcoRI

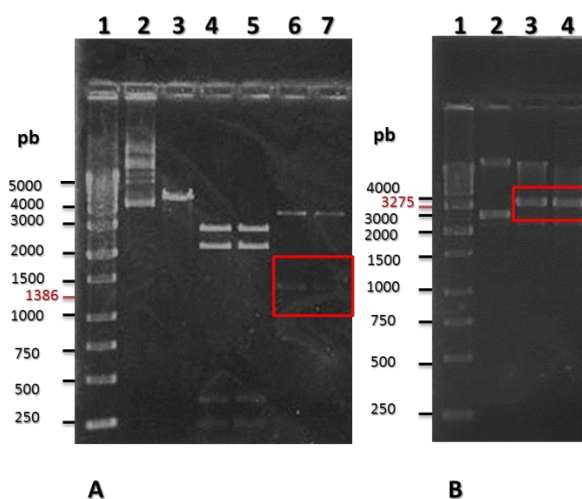


Figura 49. Análisis electroforético en gel de agarosa de la digestión enzimática con BamHI del plásmido PRKT42 mutado y del plásmido pET-17b. (A) Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) muestra PRKT42 no digerida, (3) muestra A-PRKT42 digerida con EcoRI, (4-5) muestra A-PRKT42 2nda.digestion con BamHI, (6-7) muestra B-PRKT42 2nda.digestion con BamHI. **(B)** Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) muestra vector pET-17b no digerido (3-4) muestra vector pET-17b digerido con BamHI. En todas las muestras el volumen de carga es de 5µl + 1µl Loading Buffer6X.

Como se observa en la Fig.49, en (A) la mutación del sitio de restricción para EcoRI tuvo éxito en sólo una de las Miniprep obtenidas, la B-PRKT42, de las colonias bacterianas transformadas después de la mutagénesis dirigida. Ya que se observan dos bandas y una de ellas corresponde al tamaño esperado del gen de la proteína tau. A partir de esta muestra es posible obtener el inserto purificado para proseguir con el paso de ligación. En (B) se observa que el plásmido pET-17b ha sido digerido correctamente, sin embargo, al obtener un fragmento muy pequeño de esta segunda

digestión (30pb), se realiza una comprobación que permita observar dos fragmentos con mayor claridad.

Se escoge la diana de restricción PvuII del plásmido pET-17b (Anexo i), para realizar esta comprobación y así continuar con su empleo en la siguiente etapa del proceso de este trabajo, ya que al analizarlo, se espera obtener 2 bandas, una de 2,266pb y la otra de 804pb.

Las condiciones de reacción se detallan en la Tabla.19.

Tabla 19. Condiciones reacción enzimática de pET-17b con PvuII.

pET-17b purif.
8 µl ADN _{pET-17b}
1 µl Buffer 10X
1µl PvuII

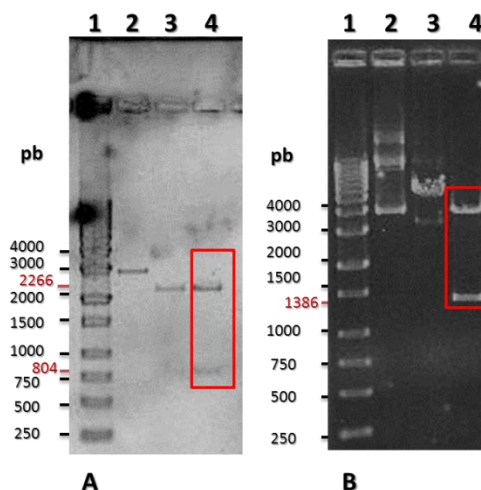


Figura 50. Análisis electroforético en gel de agarosa de la digestión enzimática con PvuII del plásmido pET-17b y la digestión enzimática del plásmido B-PRKT42 mutado en el sitio EcoRI. (A) Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) muestra pET-17b purificado no digerido, (3) muestra pET-17b purificado digerido con PvuII, (4) muestra pET-17b purificado digerido con PvuII. El volumen de muestra cargado para los carriles 3 y 4 fue de 4µl y 6µl, respectivamente. (B) Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) muestra B-PRKT42 no digerida, (3) muestra B-PRKT42 digerida con EcoRI, (4) muestra B-PRKT42 purificada y digerida por segunda vez con BamHI.

La Fig.50 (A) muestra claramente que se han obtenido las bandas esperadas para la digestión enzimática con PvuII y en (B) también es posible observar la banda correspondiente al tamaño del gen de la proteína tau digerido primero con EcoRI y posteriormente con BamHI, por lo que se comprueba que se tiene tanto el plásmido pET-17b como el inserto (gen proteína tau) listos para emplearlos en la siguiente etapa del proceso.

4.3.2. Obtención de un vector de expresión de la proteína tau mediante ligación

Una vez que se tiene el inserto purificado (gen proteína tau) y el plásmido (pET-17b) donde se ligará el inserto, se procede a preparar las cantidades necesarias para llevar a cabo la reacción de ligación (ver apartado 4.4.4). Se realiza un control, donde no se añadirá el inserto, únicamente el vector + enzima T4 ligasa.

Ya preparadas, se colocan en el termociclador y mediante el programa *LIGATION* se comienza la reacción. Al término se transforman los productos empleando células competentes DH5- α , se siembra en la placa de Lb agar + amp, y se dejan incubando O/N.

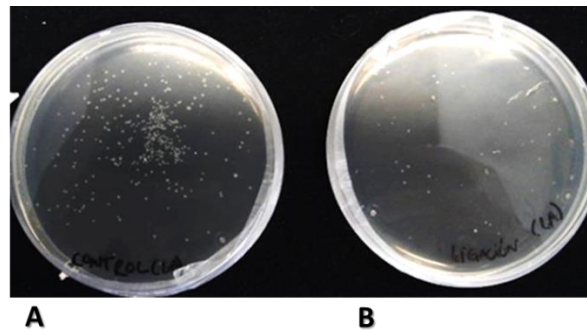


Figura 51. Análisis del producto de la reacción de ligación entre el plásmido pET-17b y el inserto del gen de la proteína tau. (A) ligación control, (B) ligación vector+ inserto.

En la Fig. 51 se puede apreciar que la placa control (A) presenta más colonias que la placa de ligación (B). Esto puede deberse a que el tratamiento con fosfatasa alcalina no haya sido exitoso, por lo que el vector volvió a ligarse consigo mismo. Al tener colonias en la placa de ligación (B), se procede a seleccionar 6 colonias diferentes para llevar a cabo mini cultivos, para procesarlos mediante la técnica de Miniprep (apartado 4.2) lo que nos permitirá obtener ADNc para comprobar mediante técnicas electroforéticas en geles de agarosa, la correcta ligación entre el plásmido pET-17b y el inserto (gen de la proteína tau).

Se analizan las dianas de restricción del plásmido pET-17b y de la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína tau, es importante que la enzima seleccionada proporcione bandas de suficiente tamaño para poder observarlas claramente, por lo tanto la enzima con la cual deberá realizarse la comprobación de la ligación es HindIII, ya que corta tanto el plásmido como el gen de la proteína, si la ligación es correcta, se esperan 2 bandas: una a 1104pb y otra a 3557pb.

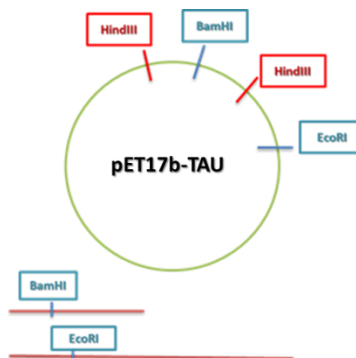


Figura 52. Esquema representativo del plásmido ligado pET17b-TAU y dianas de restricción para HindIII empleadas para comprobar la correcta ligación de producto.

La reacción se llevó a cabo con 8µl de ADNc (Miniprep A-F) +1µl Buffer SB + 1µl HindIII.

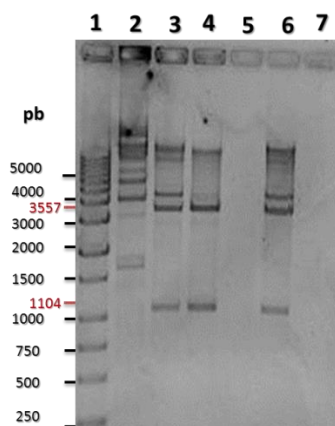


Figura 53. Análisis electroforético en gel de agarosa de la digestión enzimática con HindIII de las 6 muestras de Miniprep obtenidas posteriormente a la transformación del producto ligado entre el plásmido pET-17b y el gen de la proteína tau. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) muestra Miniprep A, (3) muestra Miniprep B, (4) muestra Miniprep C, (5) muestra Miniprep D, (6) muestra Miniprep E, (7) muestra Miniprep F. En todas las muestras el volumen de carga es de 5µl + 1µl Loading Buffer6X.

Como se observa en la Fig.53, el único carril que muestra la correcta ligación entre el plásmido pET-17b y el gen de la proteína tau, es el 4 que corresponde a la Miniprep C, ya que nos proporciona los tamaños de las bandas esperadas tras la digestión enzimática con HindIII.

Una vez que se tiene identificada la muestra que contiene la ligación correcta, se procede a realizar una última digestión enzimática para corroborar el resultado (Fig.54), esta vez se realiza una digestión con las enzimas EcoRI y BamHI, con el fin de obtener las bandas correspondientes al plásmido pET-17b (3275pb) y al gen de la proteína Tau (1386pb). Se procede a enviar una muestra para secuenciarla.

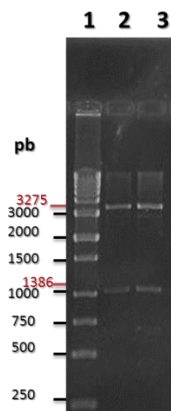


Figura 54. Análisis electroforético en gel de agarosa de la digestión enzimática con EcoRI y BamHI del plásmido ligado pET17b-TAU. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2-3) plásmido pET17b-TAU digerido con BamHI y EcoRI purificado. En todas las muestras el volumen de carga es de 5µl + 1µl Loading Buffer6X.

4.4. Expresión y purificación de la proteína humana recombinante tau en *Escherichia coli*.

La proteína tau se obtuvo en un cultivo bacteriano mediante la técnica del ADN recombinante. Se utilizó como célula huésped la cepa BL21 (DE3) de la bacteria *E. coli* la cual fue transformada con el plásmido producto de la ligación pET17b-TAU (Fig.25) para que expresara la proteína de interés.

4.4.1. Transformación e inducción y expresión de la proteína tau.

Una vez obtenida la placa correspondiente a la transformación de células DH5- α , mediante el protocolo de choque térmico, las cuales nos permiten la obtención del ADNc correspondiente al plásmido ligado pET17b-TAU, se procede a transformar de la misma forma un vial de células BL21 (DE3) de 50µl. Se plasmifica y después de un día de incubación se obtuvieron las colonias mostradas en la Fig.55, respectivamente.

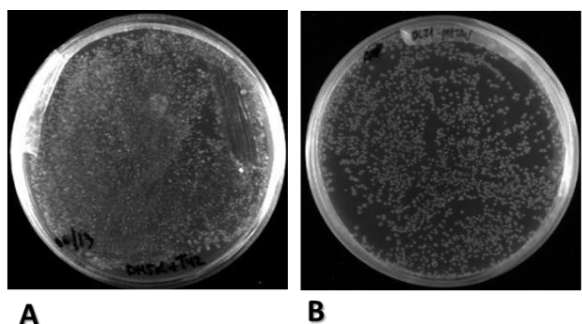


Figura 55. Análisis de la transformación del plásmido pET17b-TAU en células competentes. (A) transformación en células DH5- α . (B) Transformación en célula huésped *E. coli* cepa BL21 (DE3)

A partir de la placa obtenida (B) se procede a realizar un pre-cultivo de 10ml de medio LB + 10µl de amp, del cual transcurridas 4h se mide su DO_{600nm} , se realizan los cálculos correspondientes para conocer la cantidad de medio necesario para inocular un cultivo de 500ml de medio LB fresco y conseguir que la DO_{600nm} corresponda a 0.05. Concretamente se añaden entre 8-10ml de medio en crecimiento. Se incubo a 37°C y 230rpm, durante 3-4h. Transcurrido este tiempo se mide nuevamente la DO_{600nm} alcanzada y de encontrarse entre 0.6-0.8, se procedió a inducir el medio con IPTG a 0.4mM. Esta densidad de bacterias es importante de controlar, ya que nos indica que el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento. Al mismo tiempo se realiza un cultivo no inducido.

El cultivo se deja en crecimiento O/N de acuerdo al protocolo general de inducción. Ya que la proteína es producida de manera intracelular y no es secretada al medio, es necesario realizar un tratamiento de lisis celular con el fin de obtenerla (apartado 4.4.6). Una vez centrifugado y obtenido el sedimento bacteriano, se procede a re-suspenderlo en una solución amortiguadora preparada de la siguiente manera: Buffer 0.1mM MES, 1mM DTT, 1mM PMSF (M. Medina, et al., 1995).

Ya que las muestras han sido procesadas, se preparará el gel *SDS-PAGE* y se cargarán las muestras por duplicado de acuerdo al esquema detallado en la Fig.41.

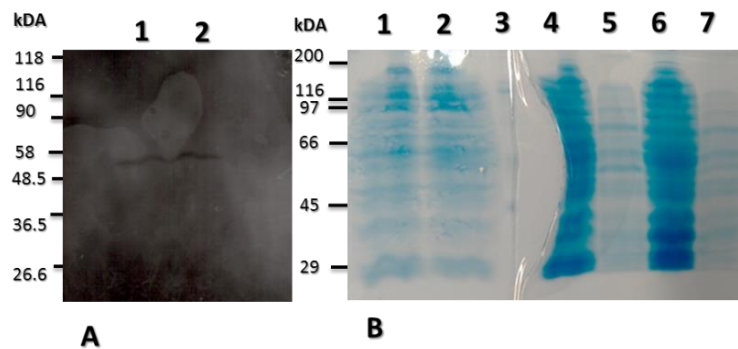


Figura 56. Análisis electroforético de la expresión de la proteína tau mediante gel *SDS-PAGE* y *Western blot*. (A) *Western blot*: Carriles (1-2) muestra sobrenadante inducido en células BL21, $V_T=15\mu l$ y $24\mu l$ respectivamente. (B) *SDS-PAGE*: Carriles (1-2) expresión tau en células BL21 transferidas a membrana de nitrocelulosa. (3) marcador de peso molecular, (4) muestra sobrenadante inducido, (5) muestra *pellet* inducido, (6) muestra sobrenadante no inducido, (7) muestra *pellet* no inducido. En todas las muestras el volumen de carga es de $24\mu l$ ($18\mu l$ muestra + $6\mu l$ *Loading Buffer*).

Como se observa en la Fig.56 (B) las bandas del gel teñido con solución de Coomassie Blue no permite la detección de la proteína expresada, sin embargo en las muestras transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para la proteína tau (A) la detección de la expresión a partir del plásmido construido pET17b-TAU se ha realizado con éxito.

4.4.2. Estandarización del protocolo de expresión de la proteína recombinante humana tau en *E.coli* analizado mediante electroforesis *SDS-PAGE* y *Western blot*.

Con el fin de estandarizar el protocolo para la expresión e inducción de la proteína tau, se decide realizar cambios en la temperatura de incubación (37°C, RT, 16°C) y en la composición del Buffer MES empleado de acuerdo a literatura consultada (MES, MES + aditivos), una vez que los 500ml de cultivo en fase exponencial han sido inducidos (Tabla.20).

Buffer MES: Buffer 0.1mM MES, 1mM DTT, 1mM PMSF.

Buffer MES + aditivos: 50mM MES; pH=6.8, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.1mM PMSF.

Tabla 20 Condiciones de incubación y Buffer de lisado para estandarizar el protocolo de expresión de la proteína Tau.

Condición-A	Condición-B	Condición-C	Condición-D
230 rpm	230rpm	230rpm	230 rpm
RT	37°C	37°C	16°C
O/N	O/N	O/N	O/N
MES	MES	MES + aditivos	MES

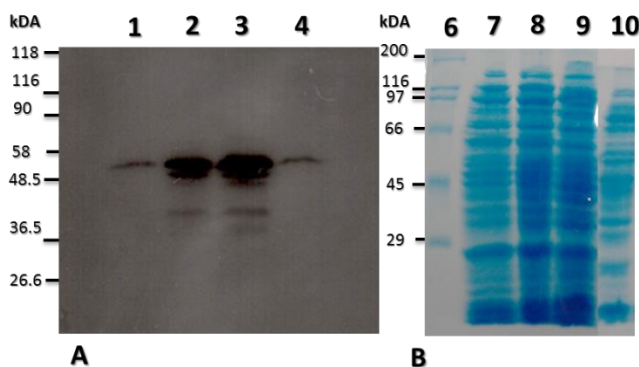


Figura 57. Análisis electroforético en gel *SDS-PAGE* y *Western Blot* de diferentes condiciones para la expresión de la proteína tau. (A) *Western Blot* revelado durante 45s: Carriles (1) muestra incubada condición-A, (2) muestra incubada condición-B, (3) muestra incubada condición-C, (4) muestra incubada condición-D (B) *SDS-PAGE*: Carriles (6) marcador de peso molecular, (7) muestra incubada condición-A, (8) muestra incubada condición-B, (9) muestra incubada condición-C, (10) muestra incubada condición-D. En todas las muestras el volumen de carga es de 40µl (30µl muestra + 10µl *Loading Buffer*4X).

La Fig.57 (A) nos permite observar que la temperatura ideal para la incubación del cultivo inducido es de 37°C, ya que a RT o 16°C la cantidad de proteína obtenida es mínima. Además podemos observar que la adición de componentes en el Buffer MES también proporciona un mejor tratamiento de lisado, por lo tanto, una mejor obtención de proteína tau expresada, como se ha descrito anteriormente (Csokova, et al., 2004).

Debido a la aparición de bandas por debajo del tamaño esperado, se decide realizar un análisis detallado del proceso de inducción, tomando alícuotas al inicio ($t=0h$), durante la inducción ($t=1.5h$, $3h$) y al término del proceso ($t=O/N$) para realizar un control electroforético. (Fig. 58). Con el fin de detectar si estas bandas corresponden a la proteína tau truncada debido al exceso en el tiempo de inducción.

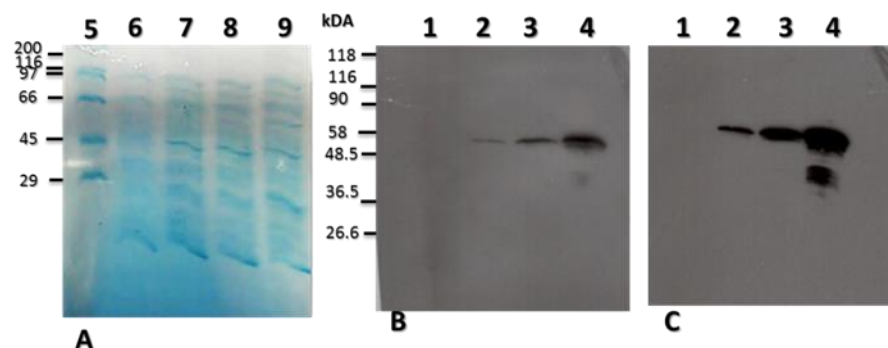


Figura 58. Análisis electroforético en gel *SDS-PAGE* y *Western blot* del proceso de inducción de la expresión a $0h$, $1.5h$, $3h$ y O/N . (A) *SDS-PAGE*, (B) *Western blot* revelado 30s, (C) *Western blot* revelado durante 1min.

La Fig.58 (A) se muestra la inducción de la expresión de la proteína tau en gel *SDS-PAGE* teñido con solución Coomassie Blue, donde es posible observar como la cantidad de proteína aumenta conforme transcurre el tiempo de inducción, así como también aumenta la presencia de otras proteínas de origen bacteriano. En la Fig.58 (B-C) se observa mediante inmunotransferencia el proceso de aumento en la cantidad de la proteína expuesto en el film fotográfico durante 30s y 1min, respectivamente, con esto es posible afirmar que el mejor tiempo de inducción es de $3h$, ya que aunque O/N se produce una mayor cantidad de proteína también se obtiene mayor cantidad de proteína truncada o dañada.

4.4.3. Purificación cromatográfica de la proteína tau.

El proceso de purificación de la proteína tau comienza con la técnica de cromatografía de intercambio catiónico utilizando un sistema FPLC ("*Fast Protein Liquid Chromatography*") en el equipo ÄKTA Purifier 10 además de una columna de 1ml *SP Sepharose Fast Flow* de GE Healthcare.

El extracto se encuentra en una solución A de 15ml de Buffer MES + aditivos (50mM MES; pH 6.8, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.1mM PMSF), esta muestra será centrifugada por 20min a 4000rpm a $4^{\circ}C$ para eliminar cualquier resto insoluble que pudiera obturar la columna. El sobrenadante será nuestra muestra de partida. Para lograr la elución de la proteína de interés se empleará una segunda solución B (50mM MES + aditivos, 1M NaCl, pH 6.8). Todas las soluciones empleadas deberán ser filtradas y sonicadas previamente.

Una vez que se ha equilibrado la columna con la solución A, se procede a cargar la muestra de partida e iniciar el programa previamente configurado en el equipo con el método detallado en la Fig.59 a un flujo constante de 1ml/min.

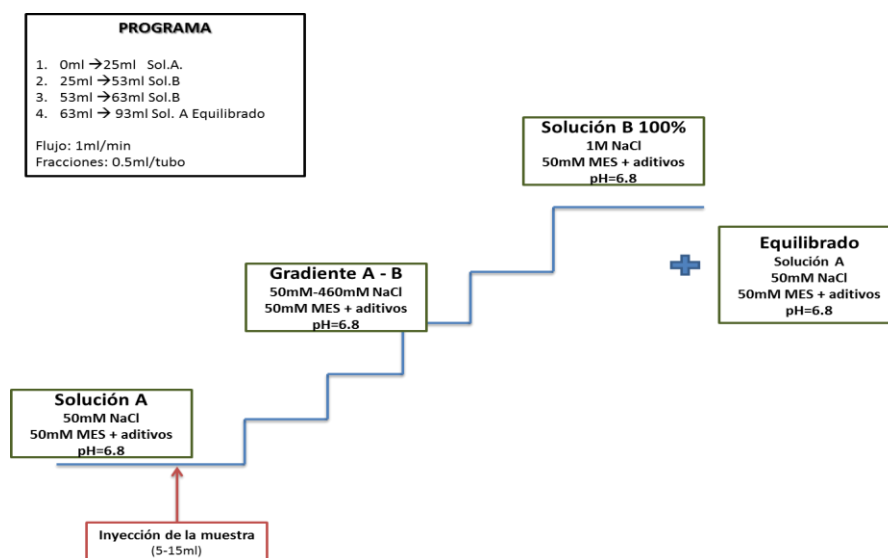


Figura 59. Esquema del programa utilizado para realizar la técnica de cromatografía de intercambio catiónico. El programa aumenta gradualmente el gradiente A-B de manera automática.

El tiempo que dura el proceso desde el equilibrado de la columna inicial hasta el equilibrado y limpieza final es de aproximadamente 1h 30min. Además de 2h previas empleadas en la limpieza y preparación del equipo.

Las fracciones recolectadas y mostradas en el cromatograma de la Fig.60 se analizaron electroforéticamente. Al ser la primera ocasión que esta proteína es expresada y purificada en el grupo de investigación, es importante el análisis de todas las fracciones obtenidas.

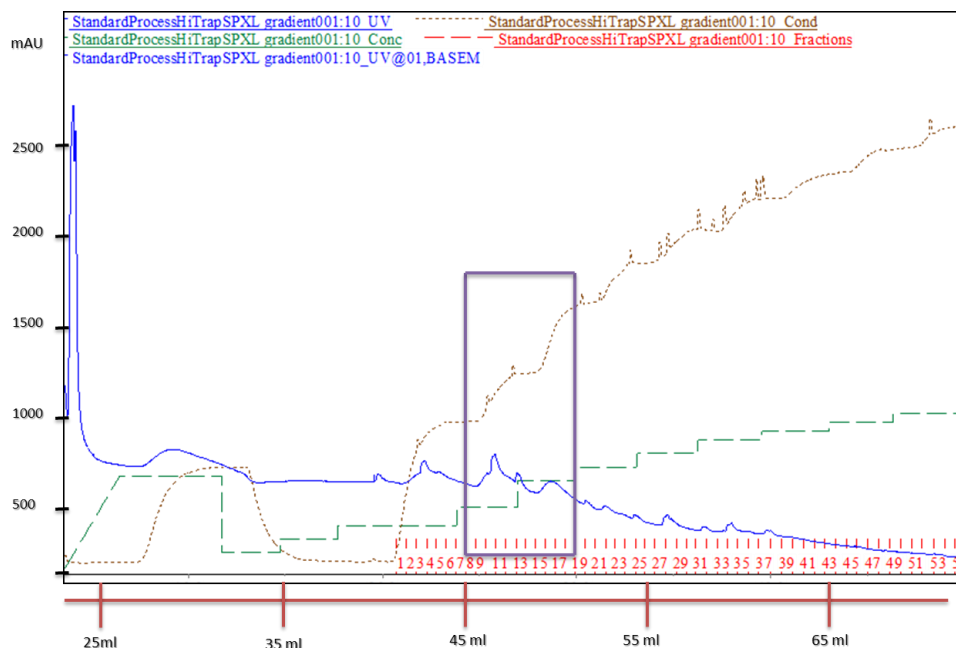


Figura 60. Cromatograma de la columna de intercambio catiónico de la muestra de partida. El recuadro morado muestra las fracciones que corresponden al gradiente reportado en la literatura donde se espera la proteína Tau eluya.

Se realizan varios geles SDS-PAGE para detectar la presencia de la proteína purificada, desde las fracciones 1-31, siendo las fracciones 10, 11 y 12 donde se logró detectarla.

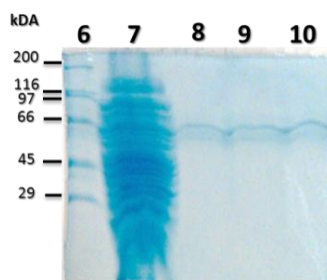


Figura 61. Purificación de la proteína Tau mediante columna de intercambio catiónico. Carriles (6) marcador de peso molecular, (7) muestra de partida sin purificar, (8) fracción eluida #10, (9) fracción eluida #11, (10) fracción eluida #12. En todas las muestras el volumen de carga es de 24µl (18µl muestra + 6µl Loading Buffer).

En la Fig.61 se observa el análisis electroforético de las muestras correspondientes a las fracciones 10, 11 y 12, las cuales se encuentran eluidas a la concentración de 220-240mM NaCl, por lo que el gradiente se encuentra dentro del reportado en la literatura (Csokova, et al., 2004).

Es importante mencionar que en esta etapa del proceso aún se requiere continuar estandarizando el método de purificación mediante el equipo ÄKTA Purifier 10 para obtener una mejor reproducibilidad del resultado en un menor tiempo de procesamiento.

Dentro de las opciones para continuar el proceso de purificación y obtener un mayor grado de pureza así como un alto rendimiento, es posible realizar una cromatografía de exclusión molecular empleando una columna de 5ml *HiLoad 16/60 Superdex 200* de la casa comercial *Amersham Biosciences*.

4.4.4. Determinación concentración proteína tau purificada mediante método de Lowry.

Para determinar la concentración de las eluciones obtenidas mediante la cromatografía catiónica es necesario realizar una curva patrón con una proteína de concentración conocida (Fig.62). En nuestro caso se emplea la albúmina de suero bovino 1% (BSA, “*Bovine Serum Albumin*”). Se deberán realizar dos blancos y el $V_T = 20\mu\text{l}$ para cada tubo Eppendorf.



Figura 62. Esquema soluciones preparadas para el método de Lowry.

Tabla 21. Absorbancias obtenidas mediante el método de Lowry para el cálculo de la concentración de tau purificada.

# Tubo	H ₂ O dest.	BSA	Absorbancia ($\lambda=660\text{nm}$)
1	20 μl	0 μl	0
2	20 μl	0 μl	0.0010
3	2 μl	18 μl	1.6007
4	4 μl	16 μl	1.2703
5	6 μl	14 μl	1.2946
6	8 μl	12 μl	1.1711
7	10 μl	10 μl	1.0080
Muestra eluida tau			
8	Control (Buffer MES)	20 μl	0.0014
9	Elución tubo #10	20 μl	0.1472
10	Elución tubo#12	20 μl	0.1927

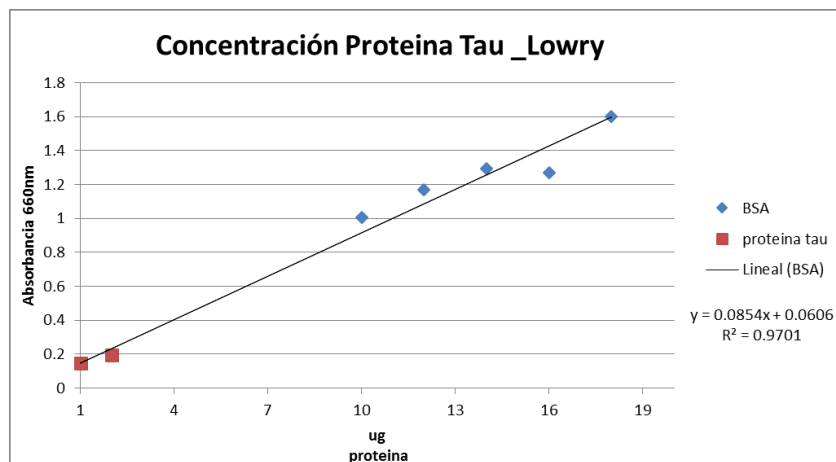


Figura 63. Curva de calibración con BSA para la obtención de la concentración de la proteína tau mediante el método de Lowry.

Lo que se puede observar en la gráfica de la Fig.63 es la concentración obtenida de proteína tau contenida en 20µl de muestra para la fracción del tubo 10 y 12. Por lo tanto, si se tienen 500µl en cada fracción la concentración total de proteína purificada será:

Tabla 22. Cantidad obtenida mediante el método de Lowry de una muestra de proteína tau recombinante purificada por cromatografía de intercambio catiónica.

Cantidad de proteína tau purificada		
	concentración en 20µl muestra	concentración total en 500µl
Fracción tubo 10	1.01288 µg	25.322µg
Fracción tubo 12	1.54566 µg	38.641 µg

5. CONCLUSIONES

La realización de este proyecto ha permitido trabajar en una serie de técnicas de biología molecular, ingeniería genética y expresión y purificación de proteínas. Además se ha obtenido la expresión de las proteínas objeto de estudio lo que debe permitir avanzar en el estudio posterior de la interacción entre la proteína tau y los receptores muscarínicos de acetilcolina.

Se ha logrado expresar unos de los receptores muscarínicos de interés, el M_3 , en una línea celular HEK-293T, la cual se caracteriza por su facilidad de mantenimiento, crecimiento y transfección. Esto permitirá más adelante realizar ensayos de interacción receptor M_3 -proteína tau. A pesar de no lograrse la expresión del receptor M_1 , tanto en células HEK 293T y COS-1, es necesario continuar con los protocolos para obtener un resultado positivo. Es posible que se deba realizar primero un análisis del plásmido empleado para comprobar su correcta secuencia, así como también de las técnicas de transfección empleadas para descartar cualquier tipo de error provocado en su ejecución. Una tercera opción será realizar la transfección del ADNc en otro tipo de línea celular, como COS-7, donde se ha reportado anteriormente su correcta expresión.

Por otro lado, un resultado importante ha sido el haber conseguido la expresión satisfactoria de la proteína recombinante humana tau, empleando diversas técnicas de ADN recombinante en un cultivo de la bacteria *E.coli* y el plásmido pET17b-TAU que se ha clonado con éxito por primera vez en nuestro laboratorio.

Se establecieron las condiciones óptimas de inducción, tiempo y temperatura de incubación, así como también se mejoró la estabilidad de la proteína al añadir al tampón aditivos extras como NaCl (estas sales ayudan a mantener la fuerza iónica del medio) y EDTA (ayuda a reducir el daño provocado por la oxidación de metales presentes en el medio) además del PMSF y DTT empleados.

Mediante procesos de purificación, basados en técnicas cromatográficas se logró por primera vez, la obtención de una muestra de la proteína de interés purificada, aunque a una concentración relativamente baja.

Se debería continuar explorando las condiciones óptimas de purificación de la proteína, ya sea empleando una columna de intercambio diferente o realizando cambios en el pH de las soluciones amortiguadoras empleadas, para obtener un producto de un mayor rendimiento de proteína tau, que permita continuar con un segundo proceso de purificación mediante una columna de exclusión molecular. Todo esto con el fin de obtener un producto altamente purificado que permita el estudio de las posibles interacciones entre la proteína tau y los receptores muscarínicos expresados debido a la importancia que presentan en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer.

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1. Referencias bibliográficas

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science Publishing.
- Allison, L. A. (2007). *Fundamental Molecular Biology*. Blackwell Publishing.
- Amersham Pharmacia Biotech. (2011). Protein Amplification and Simple Purification. In *The Recombinant Protein Handbook* (pp. 39-76). Amersham.
- Ávila, J., Lucas, J., Pérez, M., & Hernández, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.*, 84: 361–384.
- Barghorn, S., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2005). Purification of Recombinant Tau protein and Preparation of Alzheimer-Paired Helical Filaments in Vitro. In I. Sigurdsson, *Methods in Molecular Biology* (pp. Vol.299, Amyloid Proteins: Methods and Protocols.35-55). Humana Press Inc.
- Brady, A. E., & Limbird, L. E. (2002). G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal.*, 14, 297–309.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Review*, 33, 95-130.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R., Abramowski, D., & Frank, S. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse. *Nat. Cell Biol.*, 11, 909-913.
- Csokova, N., Skrabana, R., Liebig, H.-D., Mederlyona, A., Kontsek, P., & Novak, M. (2004). Rapid purification of truncated tau proteins: model of approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Science Direct, Protein Expression and Purification*, 35, 366-372.
- Deupi, X., & Kobilka, B. (2007). Activation of G protein-coupled receptors. *Advances in Protein Chemistry*, 74, 137-166.
- Deupi, X., & Standfuss, J. (2011). Structural insights into agonist-induced activation of G protein-coupled receptors. *Science direct: Current opinion in Structural Biology*, 21:541-551.
- Ellis Bell, J., & T.Bell, E. (1988). Basic concepts of Protein Purification and Characterization. En *Proteins and enzymes* (págs. 1-3). Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc.

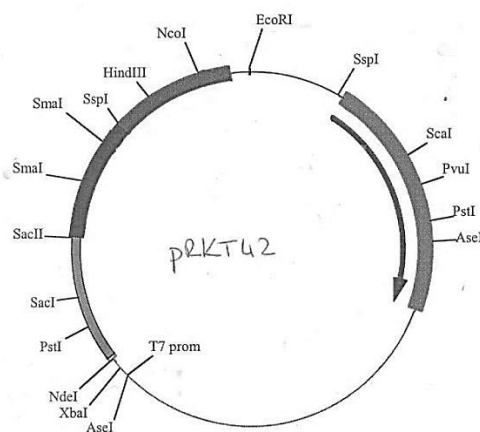
- Gendron, T. F., & Petrucelli, L. (2009). Review: The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 4:13.
- Gomez-Ramos, A., Díaz Hernández, M., Rubio, A., Díaz Hernández, J., Miras Portugal, M., & Ávila, J. (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Elsevier*, 19, 708-717.
- Gomez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M., & Ávila, J. (2006). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 37, 673-681.
- Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.*, 99, 25–44.
- Iarriccio-Silva, L. (2008, May 2). Allosteric interactions at the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Doctoral Thesis*. Barcelona & Londres.
- Iba, M., Guo, J., McBride, J., Zhang, B., Trojanowski, J., & Lee, V. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of NFT in a transgenic mouse model of Alzheimer-like tauopathy. *J. Neurosci.*, 33, 1024-1037.
- Kobilka, B. K., Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., . . . Wess, J. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482, 552-558.
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. (2012). Review Article: Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's disease.*, 731526, 13 pages.
- Lefkowitz, R. J., & Whalen, E. J. (2004). Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 162–168.
- Levey, A. I. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: Implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93: 13541–13546.
- Limbird, L. E. (1983). Beta-adrenergic stimulation of adenylate cyclase and alpha-adrenergic inhibition of adenylate cyclase: GTP-binding proteins as macromolecular messengers. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 161, 91–111.
- Luque Cabrera, J., & Herráez Sánchez, Á. (2002). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. España: Harcourt.

- M. Medina, Montejo de Garcini, E., & Ávila, J. (1995). The role of Tau phosphorylation in transfected COS-1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 148, 79-88.
- Millar, R., & Newton, C. (2010, January). The Year in G protein-Coupled Receptor Research. *Mol Endocrinol*, 24(1):261-274.
- Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262, 4,56-65.
- Park, D. J. (2011). *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols* (Third ed.). London: Springer Science: Humana Press.
- Pierce, B. (2002). Chapter 18: Recombinant DNA technology. In *Genetics: A Conceptual Approach*. W. H. Freeman Publishers.
- Satyabrata, K., Slowikowski, S., Westaway, D., & Mount, H. (2003). Interactions between B-amiloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci*, 29(6):427-41.
- Schlyer, S., & Horuk, R. (2006). I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov. Today*, 11, 481-493.
- T.May, L., Leach, K., M.Sexton, P., & Christopoulos, A. (2007). Allosteric Modulation of G-Protein Coupled Receptors. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47:1-51.
- Thathiah, A., & De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature Reviews - Neurosciences*, Vol.12, 73-87.
- Van Koopen, C. J., & Kaiser, B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacology & Therapeutics*, 98, 197-220.
- Westermeier, R. (1997). *Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, . Weinheim: Wiley-VCH.
- Whitford, D. (2005). *Proteins: Structures and Function*. England: Wiley.

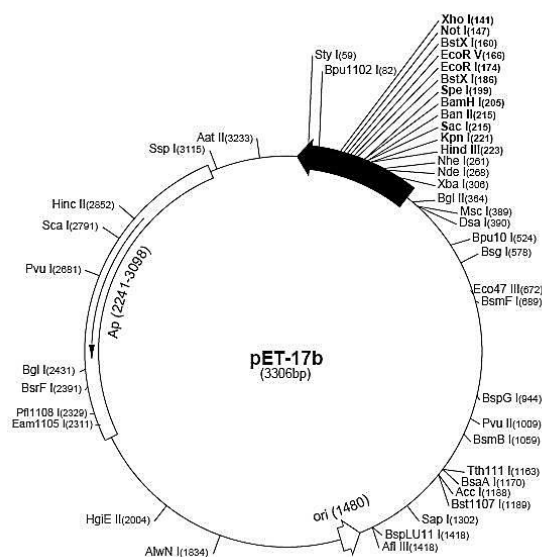
7. ANEXOS

i. Vectores empleados.

Vector PRKT42



Vector pET-17b Novagen®



ii. Protocolo de células competentes: CaCl_2

El protocolo que se sigue en el laboratorio para crear un stock de células competentes se detalla a continuación:

Siempre deberá trabajarse bajo condiciones estériles, cerca de la flama, a fin de evitar cualquier tipo de contaminación.

1. Preparar 100 ml de las siguientes soluciones: 100mM de CaCl_2 y 100mM CaCl_2 +20% glicerol. Autoclavar o filtrar cerca de la flama. Mantenerlas a 4°C.
2. Incubar 1 colonia de células o 5-10 μl de un vial de células, en 50ml de medio LB a 37°C, 230rpm y (O/N).
3. Transferir 1 ml de este cultivo a 100ml de medio LB fresco e incubar a 37°C y 230rpm. Esperar 3-4h o hasta que la $A_{600}=0.6$.
4. Una vez obtenida la absorbancia, mantener el cultivo en hielo por 25min.
5. Centrifugar 10 min a 4000rpm y 4°C.
6. Descartar el sobrenadante y re-suspender las células en 40ml de la solución 100mM de CaCl_2 . Realizar la re suspensión cuidadosamente. Mantener el cultivo en hielo durante 30min.
7. Centrifugar 10min a 4000rpm y 4°C.
8. Descartar el sobrenadante. Re suspender las células con 2ml CaCl_2 + 20% glicerol. Dividir en 40 microtubos (50 μl cada tubo). Congelar las células y mantenerlas a -80°C.
9. Una vez obtenidas las células es posible emplearlas para protocolos de transformación con otros plásmidos.

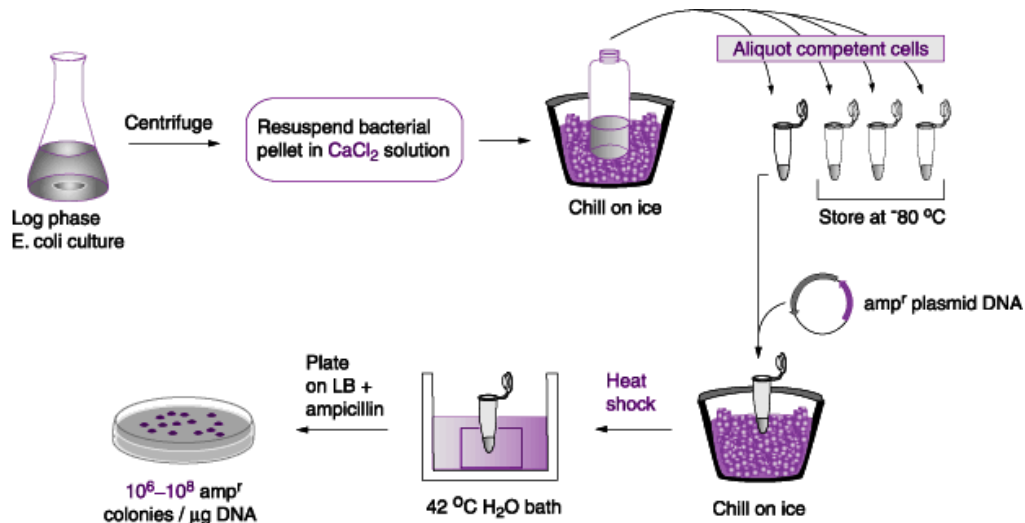


Figura 64. Esquema general de una transformación de células mediante CaCl_2 .

iii. Protocolo para crear un stock de una línea celular deseada.

Este protocolo deberá realizar bajo condiciones estériles así como dentro de una cámara de flujo laminar:

1. Tripsinizar o subcultivar las células de una placa en fase log de crecimiento con 10ml de medio por placa.
2. Transferir esta suspensión a un tubo estéril para centrifugación y centrifugar durante 5 min a 2500rpm a 4°C. Las células provenientes de 3 o más placas del mismo subcultivo pueden centrifugarse en un mismo tubo.
3. Remover y descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur de cristal estéril.
4. Preparar el medio para congelar las células (10% DMSO + 20% FBS) en un tubo Falcon de 15ml y mantenerlo a 4°C de la siguiente manera: 8ml medio DMEM + 1 ml FBS + 1ml DMSO.
5. Añadir a las células centrifugadas 1 ml de esta solución por placa. Re suspender gentilmente el pellet.
6. Pipetear alícuotas de 1ml en crio-viales previamente marcados e identificados. Apretar bien las tapas de los viales.
7. Colocar los viales durante 2-3h en una nevera a -20°C. Transcurrido este tiempo transferir los viales a -80°C durante una noche. Al otro día deberán ser almacenados en nitrógeno líquido.

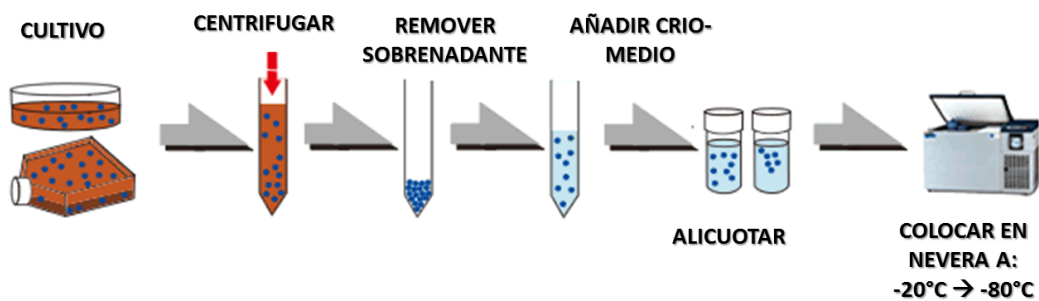


Figura 65. Esquema general del protocolo para congelar líneas celulares.

iv. Protocolo de stripping.

El siguiente protocolo (método a pH bajo) se emplea para remover los anticuerpos primario y secundario de una membrana transferida con receptores o proteína después de haber sido incubados y revelados con la solución de detección. Esto nos permite incubar nuevamente la membrana con los mismos anticuerpos o diferentes. En nuestro caso se empleó para mantenerla en solución de bloqueo mayor tiempo y evitar, al revelar, tener ruido (*background*) en el film fotográfico y obtener bandas mucho más claras.

1. Preparar 100ml de una solución de 25mM glicina + 1%SDS a pH 2. (*Buffer Stripping*)
2. Incubar la membrana a RT y agitación lenta durante 30min.
3. Lavar 3-4 veces durante 10 min con PBS1X + 0.1%Tween o TTBS
4. Comenzar el protocolo para *Western blot* a partir de la etapa de incubación con la solución bloqueo.

v. Equipos empleados

<u>EQUIPO</u>	<u>MARCA</u>	<u>PROCESO</u>
Autoclave	DARLAB K-400	Sistema esterilización: medios, puntas, Eppendorf's.
Baño térmico	DARLAB Bath-100	Sistema de Calentamiento: Medios de cultivo, PEI, OPTIMEM, FBS.
Baño térmico Eppendorf	Grant Boekel	Sistema de choque térmico
Bomba Millipore	Millipore Vacuum Pump XF54 230 50	Sistema esterilización soluciones.
Cámara de cultivos	NUAIRE TM <i>Biological Safety Cabinets</i>	Sistemas de extracción
Cámara de flujo laminar	Burdinola 21 Space	
Centrífuga alta velocidad: Eppendorfs	Biocen <i>Orto-Alresa</i>	Centrifugación
Centrífuga Benchtop (refrigerada)	Beckman Coulter <i>Allegra® X-15R Centrifuge</i>	
Centrífuga Benchtop (refrigerada)	Alresa <i>Digicen R.</i>	
Centrífuga de alta velocidad	Kubota <i>High Speed Refrigerated Centrifuge 6500</i>	
Ultracentrífuga	Beckman Coulter <i>OptimaTM LE-80K Ultracentrifuge</i>	
Electroforesis SDS-PAGE	Biorad Mini Protean II Cell <i>(Biorad Model 1000/500 Power Supply)</i>	Sistemas de Electroforesis
Electroforesis geles de agarosa	Biorad Horizontal Electrophoresis Sub-Cell GT	
Western Blot	Biorad Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell <i>(Biorad PowerPac Universal Supply 500V/2.5A/500W)</i>	

Espectrofotómetro	Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer <i>Programa Cary (100) Win</i>	Espectroscopia
Filtro cuarto oscuro	KODAK 2 <i>Safelight filter CAT.142 1418</i>	Revelados film X-Ray
FPLC	ÄKTA Purifier <i>GE HEALTHCARE</i>	Cromatografía catiónica y de exclusión molecular
Homogeneizador ultrasonidos	Bandelin Electronic Sonoplus UW 2070	Rompimiento Celular
Incubadora (x3): Cultivos Eucariota	NUAIRE™ <i>US AUTOFLOW</i> <i>CO₂ Water-Jacketed Incubator</i>	Sistemas de Incubación
Incubadora Agitado: Cultivos Procariota	Sartorius stedim Biotech <i>CERTOMAT® BS-T</i>	
Incubadora: Placas Petri	SANYO Incubator	
Incubadora en frío	SANYO incubator	
Microscopio	Olympus (CK/30)	Microscopía
pH-metro	HANNA INSTRUMENTS pH 213 <i>Microprocessor pH Meter</i>	Sensor/Método electroquímico
Congelador -80°C	REVCO Legaci	Sistemas de Refrigeración
Cámara fría	Isark by Coldkit	
Sistema Imaging	Biorad Molecular Imager ChemiDoc XRS + Image Lab Software	Imaging
Termociclador	Biorad MJ Mini Personal Thermal Cyclor	PCR Mutagénesis dirigida

Transiluminador	Biorad UV Transilluminator 2000	Observación bandas gel agarosa +bromuro de etidio
Vortex	Heildolph REAX Top	Sistema de agitación
Placa mecánica		

vi. Soluciones empleadas

Tabla 23. Solución amortiguadora para geles SDS-PAGE.

TGS 10X (1L)	
Tris	30
Glicina	144
SDS	10
pH	8.3
Aforar con H ₂ O destilada a 1L	

Tabla 24. Composición de la solución de desteñido de los geles SDS-PAGE

Sol. Coomassie Desteñidora	
Metanol	400ml
CH ₃ COOH	100ml
HCl	4ml
pH	8
H ₂ O dest. a 1L	

Tabla 25. Loading Buffer SDS-PAGE

Loading Buffer SDS-PAGE4X	
Tris	0.0625M
SDS	2%
Glicerol	10%
β-mercaptoetanol	5%
azul de bromofenol	0.1%

Aforar con H₂O dest. Hasta 5ml. Alícuotas en 5 tubos Eppendorf (V=1ml) Mantener a -20°C

Tabla 26. Condiciones preparación Buffer PBS10X.

PBS10X	
NaCl	1.37M
KCl	27mM
Na ₂ HPO ₄ I	100mM
KH ₂ PO ₄	18mM
Ajustar pH=7.4. Aforar con H ₂ O dest. Hasta 1000ml. Mantener a temperatura ambiente. Una vez que se disuelva para crear PBS1X y esterilizado, mantener a 4°C.	